

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Biologia Vegetal**



**Caracterização genética de *Staphylococcus* e  
*Lactobacillus* isolados de produtos cárneos  
fermentados com capacidades tecnológicas e  
protetoras**

**Cláudia Vanessa Cardoso Rebelo**

**Dissertação**  
**Mestrado em Biologia Molecular e Genética**  
**2014**

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Biologia Vegetal**



**Caracterização genética de *Staphylococcus* e  
*Lactobacillus* isolados de produtos cárneos  
fermentados com capacidades tecnológicas e  
protetoras**

**Cláudia Vanessa Cardoso Rebelo**

**Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria João  
Fraqueza e pelo Professor Doutor Francisco Dionísio**

**Mestrado em Biologia Molecular e Genética**

**2014**

# **Mestrado em Biologia Molecular e Genética**

## **2014**



### **Caracterização genética de *Staphylococcus* e *Lactobacillus* isolados de produtos cárneos fermentados com capacidades tecnológicas e protetoras**

**Cláudia Vanessa Cardoso Rebelo**

Esta tese foi totalmente realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob a supervisão direta da Professora Dr. Maria João Fraqueza.

O Professor Dr. Francisco Dionísio foi o orientador interno designado no âmbito do Mestrado em Biologia Molecular e Genética da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Doutora Maria João Fraqueza, pela sua disponibilidade, dedicação, orientação e por me ter facultado todas as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador interno, Doutor Francisco Dionísio por ter sido a minha ligação à Faculdade de Ciências.

À Zé e à Lena por todas as ajudas prestadas, pela amizade e simpatia com que me receberam no laboratório.

À Ana Martins pela amizade e apoio demonstrados mesmo à distância.

Às minhas colegas de laboratório, Mariana, Clénira e Ana, pelo apoio e por me animarem em dias complicados.

Ao meu espetacular namorado que aturou os meus dramas e me ajudou sempre que foi necessário.

À Bruxinha e ao Ouriço, por me apoiarem e acreditarem em mim.

**FCT** Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

Este trabalho foi subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto “Portuguese traditional meat products: strategies to improve safety and quality” (PTDC/AGRALI/119075/2010).

## Resumo

A necessidade de satisfazer as exigências dos consumidores por alimentos com menos conservantes leva ao desenvolvimento de sistemas alimentares onde se criam obstáculos naturais que impedem o desenvolvimento e crescimento de patogênicos, estendendo assim a vida de prateleira ou melhorando a qualidade sensorial dos alimentos.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente isolados do gênero *Staphylococcus* e *Lactobacillus* de produtos cárneos fermentados que tenham capacidades tecnológicas e protetoras com o intuito de os selecionar para culturas *starter* ou protetoras.

No caso dos *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* averiguou-se a presença de determinantes genéticos associados à resistência a antibióticos como a tetraciclina, potencialmente relacionados com elementos móveis, com o sentido de selecionar estirpes presuntivamente seguras. Efetuou-se ainda a avaliação da suscetibilidade a antibióticos de alguns isolados de *Staphylococcus*, através do teste por difusão de discos para penicilina e oxaciclina. A caracterização genética de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus sakei* relacionou-se com a sua potencial capacidade bactericinogénica e efetiva expressão dos genes relacionados com a produção de bacteriocinas.

Dos 27 SCN testados 44,4% mostraram ser resistentes à penicilina (10U) e 25,9% à oxaciclina (1µg). Relativamente à presença de elementos genéticos de resistência à tetraciclina verificou-se que o número de isolados com o gene pesquisado *tet*(M) foi reduzido.

Enquanto a presença do gene codificante *tet*(K) ocorreu numa frequência de 70,7% no caso dos *S.xylosus* e de 100% no caso dos *S.equorum*, o gene *tet*(L) apresentou-se com uma frequência de 9,8% no caso dos *S.xylosus* e nula no caso dos *S.equorum*.

Dos isolados *Lactobacillus plantarum* testados, destacou-se o P3B7 por ser o único portador de todos os genes em estudo relacionados com a produção de plantaricinas. Os *Lactobacillus sakei* L1B8, P2B3 e L3B8 são portadores de genes codificantes para a sacarina P e Q.

## Palavras chave

*Lactobacillus*, *Staphylococcus*, Produtos cárneos fermentados, culturas *starter*, genes de resistência

## Abstract

The need to comply with consumer demands for food with less conservatives leads to the development of food systems where hurdles to the growth and development of pathogens are created, therefore extending the shelf live and even the sensory quality of food supplies.

The goal of this assignment was to genetically characterize *Staphylococcus* and *Lactobacillus* strains of fermented meat products that have technological and protective abilities, aiming to select them to starter or protective cultures.

For *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* the presence of genetic determinants associated with resistance to antibiotics like tetracycline, potentially related with mobile elements, was evaluated to select presumably safe strains. This study was enhanced with the evaluation of the susceptibility of some *Staphylococcus* strains to antibiotics, through diffusion disc testing for penicillin and oxacillin.

The genetic characterization of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* was crossed with their potential bacteriocinogenic ability and with the specific expression of genes related to the production of bacteriocins.

Of the 27 SCN tested, 44,4% were penicillin resistant (10U) and 25,9% were oxacillin resistant (1µg).

Regarding to the presence of tetracycline resistance elements the number of isolates with the researched gene tet(M) was reduced.

While the presence of the codifying gene tet(K) occurred with a 70,7% frequency in *S. xylosus* and 100% frequency in *S. equorum*, the tet(L) gene presented itself with a 9,8% frequency in *S. xylosus* and 0% in *S. equorum*.

From the *Lactobacillus plantarum* tested, the P3B7 stood out for being the single carrier of all the genes studied related to the production of the plantaricins. The *Lactobacillus* L1B8, P2B3 and L3B8 were discovered to be carriers of the codifying genes for bacteriocins P and Q.

## KeyWords

*Lactobacillus*, *Staphylococcus*, fermented meat products, starter cultures, Resistance genes

## Índice

1. Introdução .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	2
2.1. Fermentação de produtos cárneos.....	2
2.2. Culturas de Arranque (Starter).....	3
2.3. Critérios de seleção para garantia da utilização de agentes microbiológicos presuntivamente seguros. ....	3
2.4. <i>Staphylococcus</i> .....	4
2.5. Resistência a Antibióticos .....	4
2.6. Tetraciclina.....	5
2.7. Resistência a Meticilina/oxaciclina.....	5
2.8. <i>Lactobacillus</i> .....	6
2.9. Bacteriocinas.....	6
3. Caracterização genética de <i>Staphylococcus</i> , e <i>Lactobacillus</i> isolados de produtos cárneos fermentados com capacidades tecnológicas e protetoras.....	8
3.1. Objetivos.....	8
3.2. Materiais e métodos.....	8
3.2.1. Coleção de Isolados .....	8
3.2.2. Identificação e caracterização Genotípica dos Isolados .....	9
3.2.2.1. Extração de ADN Cromossomal.....	9
3.2.2.1.1. Cultivo dos isolados para o Processo de Extração .....	9
3.2.2.1.2. Extração de ADN.....	9
3.2.2.2. Procedimentos de PCR.....	10
3.2.2.2.1. PCR <i>Fingerprinting</i> /Tipificação Genómica .....	10
3.2.2.2.2. PCR para a deteção de genes envolvidos na produção de plantaricinas para <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	10
3.2.2.2.3. PCR para a deteção de genes envolvidos na produção de sakacinas para <i>Lactobacillus sakei</i> .....	11
3.2.2.2.4. PCR de Deteção de presença dos genes de resistência <i>tet</i> <sup>s</sup> (M), (L) e (K) .....	12
3.2.2.3. <i>Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)</i> .....	13
3.2.3. Testes De Expressão Fenotípica.....	13
3.2.3.1. Teste de Sensibilidade a Antibióticos .....	13
3.2.3.2. Caracterização Proteómica.....	14
3.2.3.2.1. Extração de Proteínas Totais (SDS-PAGE).....	14
3.2.4. Análise estatística .....	15
4. Resultados .....	16
4.1. PCR <i>Fingerprinting</i> /Tipificação.....	16



4.1.1. PCR fingerprinting - Género <i>Staphylococcus</i> .....	17
4.1.2. PCR fingerprinting - Género <i>Lactobacillus</i> .....	18
4.2. Detecção de genes envolvidos na produção de plantaricinas para <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	19
4.3. Detecção de genes envolvidos na produção de sacacinas para <i>Lactobacillus sakei</i> .....	21
4.4. Proteínas totais .....	21
4.5. Pulse Field Gel Eletroforeses (PFGE) .....	23
4.6. PCR de Detecção da presença dos Genes de Resistência tet <sup>s</sup> (M), (L) e (K) ....	23
4.7. Suscetibilidade Fenotípica à Oxacilina .....	24
5. Discussão de Resultados.....	25
6. Conclusões .....	28
Referências Bibliográficas.....	30
Anexo.....	1

## Índice de Figuras

Figura 1 - PCR Fingerprinting com o primer de repetição OPC-19, de isolados de <i>Staphylococcus xylosus</i> . .....	17
Figura 2 - PCR Fingerprinting com o primer de repetição M13, de isolados de <i>Lactobacillus</i> . .....	18
Figura 3 - Análise comparativa dos fingerprinting e presença ou ausência de genes que codificam para plantaricinas em <i>Lactobacillus plantarum</i> . .....	20
Figura 4 - Perfis SDS-PAGES em diferentes condições. ....	22
Figura 5 - Representação dos Fingerprintings obtidos por PFGE. ....	23

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Descrição das bacteriocinas produzidos por BAL. (adaptado de Klaenhammer, 1993).....	7
Tabela 2- Descrição da origem e recolha dos isolados em estudo.....	8
Tabela 3- Primers utilizados na reação PCR Fingerprinting. ....	10
Tabela 4-Primers e condições utilizados na reação de PCR para a detecção de genes do locus pln amplificados por PCR classificados em operões.....	11
Tabela 5 - Primers e condições utilizados na reação de PCR para a detecção de genes de sacacinas. ....	12
Tabela 6 - Primers utilizados no PCR de detecção de presença das tet's(M), (L) e (K). ....	12
Tabela 7 - Lista dos antibióticos em testes, respetivas concentrações e cutoff points utilizados como critério de classificação da suscetibilidade. ....	14
Tabela 8 - Staphylococcus Coagulasse Negativa testados, qualificados como resistentes (R) ou sensíveis (S). ....	24

## **Lista de Abreviaturas**

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

BAL - Bactérias Ácido Lácticas

BHI - *Brain Hart Infusion*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EFSA - *European Food Safety Authority*

EUA - Estados Unidos da América

GRAS - *Generally Regarded as Safe*

MRS - *Man Rogosa Sharpe*

MSA - *Manitol Salt Agar*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

QPS - *Qualified Presumption of Safety*

SCN - *Staphylococcus* Coagulase Negativa

SCP - *Staphylococcus* Coagulase Positiva

t-RNA - Ácido Ribonucleico transportador

UPGMA - *Unweighted Pair Groups using Arithmetic averages*

USA - *United States of America*

V - Volts

## **Lista de Símbolos e Siglas**

°C - Graus Celsius

h - Horas

min - Minutos

mm - Milímetros

rpm - Rotações Por Minuto

R - Resistente

S - Sensível

Seg - Segundo

tet - Gene de Resistência à Tetraciclina

U - unidades

% - Percentagem

## 1. Introdução

A carne é extremamente sensível à contaminação e deterioração microbiológica devido às suas características intrínsecas nomeadamente a sua elevada atividade de água (0.99), o seu elevado pH (5.8-6.0) e a disponibilidade de nutrientes que apresenta necessitando assim de cuidados especiais de armazenamento (Hugas *et al.*, 1996; Leistner, 2000).

Para conservação da qualidade nutritiva, organolética e microbiológica dos mais variados alimentos, uma das tecnologias mais utilizadas é a fermentação. Um dos exemplos típicos é a fermentação da carne dando origem a uma variedade enorme de produtos cárneos.

Esta prática de fermentação da carne é bastante antiga e foi evoluindo sendo aperfeiçoada ao longo do tempo de modo a garantir a conservação dos produtos durante longos períodos de tempo e mantendo determinados parâmetros de qualidade e, principalmente, de segurança para o consumidor (Paulsen *et al.*, 2011; Zeuthen, 2007).

A fermentação nos produtos cárneos pode ocorrer de forma espontânea, promovida por microrganismos presentes na própria carne, ou pela adição de bactérias específicas vulgarmente denominadas por *starters* (Cocconelli, 2007).

A adição de *starters* nos produtos cárneos tem diferentes propósitos, nomeadamente diminuir o tempo de fermentação e aumentar o período de conservação do produto cárneo, bem como garantir a estabilidade da sua qualidade organolética, microbiológica, físico-química e nutricional. As culturas *starter* são compostas essencialmente por Bactérias Ácido Lácticas (BAL) e *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN) (Rossi, Tofalo, Toriani & Suzzi, 2001; Lauková *et al.*, 2010).

As BAL são muito utilizadas em fermentações para diversificação e conservação da qualidade dos alimentos. O uso de bactérias lácticas neste processo começa por se manifestar pela consequente produção de ácido láctico que leva, por sua vez, à diminuição do pH. Estas bactérias produzem também vários compostos antimicrobianos como peróxido de hidrogénio, dióxido de carbono, diacetil e bacteriocinas. O aparecimento destas substâncias inibe a multiplicação de espécies microbianas patogénicas e deterioradoras nos alimentos (Gao *et al.*, 2014)

Os SCN e LAB selecionados para o uso de culturas *starter* na indústria alimentar devem ser seguros sob o ponto de vista microbiológico e toxicológico. Portanto, a capacidade de produzirem aminas biogénicas e nitrosaminas são critérios importantes a ser considerados na escolha destes microrganismos. É, também, essencial que as estirpes não produzam enterotoxinas nem transportem genes de resistência a antibióticos.

Este trabalho teve como objetivo a caracterização genética de *Staphylococcus* e *Lactobacillus* isolados de produtos cárneos fermentados com capacidades tecnológicas e protetoras.

Este trabalho é composto por 6 capítulos. No primeiro e presente capítulo apresenta-se a introdução, objetivos e estrutura do trabalho. O segundo capítulo é composto pela Revisão Bibliográfica, onde se expõe a principal informação disponível sobre os temas estudados.

O terceiro e principal capítulo deste trabalho inclui os objetivos do trabalho e a descrição de todos os materiais e métodos utilizados.

No quarto capítulo apresentam-se os resultados obtidos e no quinto a discussão dos mesmos. As conclusões e possíveis desenvolvimentos futuros ao trabalho são apresentados no sexto capítulo.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Fermentação de produtos cárneos**

A fermentação espontânea de carne baseia-se na multiplicação da microbiota indígena. O facto de os produtos cárneos fermentados poderem conter microrganismos patogénicos, para além dos oportunistas, representa um risco de segurança para o consumidor (Casquete *et al.*, 2012; Marty *et al.*, 2012). Na fermentação espontânea de carnes, as bactérias ácido lácticas derivadas de matérias-primas ou do meio ambiente fabril são responsáveis pela produção de ácido láctico resultante da utilização de hidratos de carbono, e consequentemente pelo baixo valor de pH (5,9-4,6). Como resultado da diminuição do pH, a proteína muscular coagula, aumentando a firmeza e coesão do produto final e melhorando a possibilidade do produto ser fatiado (Hugas *et al.*, 1997; Dicks *et al.*, 2004). Finalmente, a inibição de bactérias patogénicas é uma consequência da acumulação de ácido láctico, bem como de ácido acético, ácido fórmico, etanol, amónio, ácidos gordos, peróxido de hidrogénio, acetaldeído, e bacteriocinas (Hugas *et al.*, 1997).

Hoje, a moderna indústria de carne tem de garantir elevada qualidade, reduzir a variabilidade e melhorar as características organoléticas na produção de produtos cárneos fermentados, tal não é viável utilizando métodos de fermentação espontânea. Para combater esta adversidade desenvolveram-se culturas *starter* que permitiram reduzir os tempos de fermentação, garantir baixos teores de nitrato e nitrito residual no produto final e padronizar as características organoléticas (Hugas *et al.*, 1997; Hammes, 2012). No que diz respeito à importância das bactérias, pode ser observado que a maioria das culturas *starter* comercialmente disponíveis, são misturas de uma estirpe de bactérias ácido lácticas e uma estirpe de estafilococos e/ou do género micrococcos (Rossi, Tofalo, Toriani, & Suzzi, 2001).

Em processos de produção industrial para combater a microbiota indígena durante o processo de maturação da carne, são aplicados *starters* comerciais na massa de carne introduzindo-se assim um elevado número de células bacterianas ( $> 10^6$  células / g) (Talon *et al.*, 2008).

## **2.2. Culturas de Arranque (Starter)**

Culturas *Starter* podem ser definidas como preparações que contêm microrganismos vivos ou em estado latente que se desenvolvem pela fermentação de um determinado substrato presente no meio, estas culturas são utilizadas com o propósito de modificar de forma benéfica as propriedades dos alimentos, dentre os quais, as carnes e os produtos cárneos (Elias *et al.*, 2005).

A adição desses microrganismos apresenta quatro objetivos principais: melhorar a segurança do produto através do controle de agentes patogénicos pela competição entre eles, aumentar a vida útil do produto pela inibição de microrganismos de deterioração, diversificar o produto modificando a matéria-prima a fim de obter novas propriedades sensoriais e promover benefícios à saúde através de efeitos positivos na microbiota intestinal (Wigley, 1999).

O metabolismo de culturas de *starter* pode contribuir de várias maneiras para o controlo de agentes patogénicos, durabilidade e qualidades sensoriais. Abordagens modernas de conservação biológica têm sido desenvolvidas tendo em vista a redução de perigos/riscos para a saúde sem alterar a qualidade sensorial do produto.

Por vezes é feita uma distinção entre culturas *starter* e culturas protetoras mas, na realidade, podem-se tratar das mesmas culturas aplicadas para diferentes fins sob diferentes condições (EFFCA, 2011).

## **2.3. Critérios de seleção para garantia da utilização de agentes microbiológicos presuntivamente seguros.**

Uma grande variedade de bactérias e fungos são utilizados na produção de alimentos, quer diretamente quer como fonte de aditivos ou enzimas alimentares. Alguns deles têm uma longa história de uso aparentemente seguro, enquanto outros são menos compreendidos e podem representar um perigo para os consumidores (EFSA, 2013).

Em termos de segurança dos alimentos, a utilização de SCN e BAL como culturas *starter* nos alimentos fermentados tem sido questionada devido ao seu envolvimento em processos infecciosos, produção de enterotoxinas (Zell *et al.*, 2008), produção de aminas biogénicas (Vidal-Carou, Veciana-Nogués, Latorre-Moratala & Bover-Cid, 2007) e ainda pela possibilidade de transportar genes de resistência a antibióticos (Cocconcelli, 2007), questões de grande importância na realidade da saúde pública.

Aspetos de segurança de culturas *starter* são de extrema importância e tem gerado ainda mais atenção com a introdução da avaliação de risco pela *European Food Safety Authority* (EFSA, 2014) para os microrganismos utilizados na cadeia alimentar com fins tecnológicos. Uma grande preocupação que tem tido destaque no conceito de *Qualified Presumption of Safety* (QPS), semelhante ao sistema *Generally Recognized as Safe* (GRAS) nos EUA, é a



presença de genes transferíveis de resistência a antibióticos, bem como a produção de toxinas ou aminas biogénicas no produto final.

#### **2.4. *Staphylococcus***

Bactérias do género *Staphylococcus* são normalmente agrupados em *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) ou negativa (SCN) (Resch *et al.*, 2008). Entre os SCN, as espécies *S. equorum* e *S. xylosus* estão associados a alimentos ou desempenham um papel importante na indústria de processamento alimentar (Ordóñez *et al.*, 1999; Resch *et al.*, 2008). Estirpes de *S. xylosus* são usados em culturas *starter* para a fermentação de carnes. As restantes espécies de SCN são frequentemente isoladas de alimentos fermentados, portanto, podem ter potencial para futura aplicação como culturas *starter* (Bockelmann, 2002; Tanasupawat *et al.*, 1992; Place *et al.*, 2003).

#### **2.5. Resistência a Antibióticos**

As bactérias podem apresentar uma resistência natural ou adquirida a determinados antibióticos. A resistência natural (intrínseca) é uma característica inerente às espécies bacterianas que impedem a ação do antibiótico. Este tipo de resistência está presente em todas as estirpes de uma dada espécie e é expressa por genes cromossomais. A resistência adquirida pode ser devida a uma modificação genética do microrganismo, na qual estirpes resistentes surgem de espécies bacterianas sensíveis geralmente após exposição ao agente antimicrobiano (Ammor, Flórez & Mayo, 2007; Todar, 2013). A resistência adquirida pode ocorrer quer por mutações cromossomais ou por transferência horizontal de genes de elementos genéticos móveis que transportam genes de resistência a antibióticos. As bactérias que contêm elementos transmissíveis de resistência a antibióticos são um risco para a saúde pública, uma vez que podem atuar como um reservatório para a disseminação de genes de resistência, especialmente em ambientes com uma comunidade microbiana densa (Salysers *et al.*, 2004; Haug *et al.*, 2011; Marty *et al.*, 2012). Consequentemente, as bactérias associadas a alimentos que abrigam tais genes transferíveis de resistência a antibióticos são uma grande preocupação. Quando alimentos, tais como produtos cárneos fermentados são consumidos, acumulam-se altas quantidades de bactérias vivas no trato intestinal humano (Haug *et al.*, 2011; Salysers *et al.*, 2004; Marty *et al.*, 2012). Pesquisas recentes mostraram que a resistência a antibióticos com importância terapêutica, também ocorre em estirpes dos importantes microrganismos *starter* *S. carnosus* e *S. xylosus* (Gardini *et al.*, 2003; Kastner *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2006; Resch *et al.*, 2008; Marty *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de resistência aos antibióticos entre bactérias continua a ser uma preocupação séria. Por esta razão, os microrganismos viáveis utilizados como agentes ativos adicionados em alimentos que apresentem resistência a antibióticos, não devem ser

adicionados ao conjunto de genes de resistência antimicrobiana já presentes na população bacteriana do intestino pois pode-se aumentar o risco de transferência de genes de resistência a antibióticos.

## **2.6. Tetraciclina**

Tetracilinas são agentes estruturais anti microbianos cuja origem pode ser semissintética ou natural e que inibem a síntese de proteína ao nível ribossomal, bloqueando o recetor da subunidade 30S que se liga ao t-RNA durante a tradução, de certas bactérias gram-positivas e gram-negativas (Pereira-Maia, Silva & Almeida, 2010). Os agentes dentro deste grupo são intimamente relacionados e, salvo algumas exceções, apenas pode ser necessário testar rotineiramente a tetraciclina. Os microrganismos suscetíveis à tetraciclina são também considerados suscetíveis à doxiciclina e à minociclina. No entanto, alguns organismos considerados intermédios ou resistentes à tetraciclina podem ser suscetíveis à doxiciclina, à minociclina ou a ambas.

## **2.7. Resistência a Meticilina/oxaciclina**

Historicamente, a resistência às penicilinas penicilinase-estáveis antiestafilocócicas tem sido denominada como resistência à meticilina, e os acrónimos “MRSA” (*methicillin-resistant S. aureus*) ou “MRS” (para *Staphylococcus* resistentes à meticilina) são ainda frequentemente utilizados, mesmo tendo em conta que a meticilina já não é o agente de destaque no que diz respeito aos testes e tratamentos.

A resistência à meticilina está ligada ao gene *mecA*, que tem elevada influência na produção de uma proteína de ligação à penicilina (PBP 2<sup>a</sup>), e pode ser expressada tanto homogeneamente como heterogeneamente (CLSI, 2008). A resistência homogénea é detetada com maior facilidade através de métodos de teste *standard*, por outro lado, a resistência heterogénea pode ser mais difícil de detetar, através de certos métodos, uma vez que apenas uma pequena fração da população (aproximadamente 1 em cada 100000 células) apresenta o fenótipo de resistência. No passado, a resistência a outras classes de agentes servia como prova de resistência à meticilina, no entanto veio-se a descobrir que alguns MSRA, como por exemplo aqueles encontrados em infeções associadas a comunidades, não são multi-resistentes (CLSI, 2008).

Com a disseminação de *Staphylococcus* resistentes à meticilina nos hospitais e na comunidade, são necessários métodos de deteção rápidos e confiáveis. Tal deteção em *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) tem sido muito difícil, portanto, para despiste através de testes *in vitro*, a oxaciclina é de todas as penicilinas penicilinase-estáveis a mais apropriada, no entanto, foi recomendado como método padrão a deteção do gene *mecA* ou proteína de ligação à penicilina (PBP 2<sup>a</sup>), sendo um método mais rigoroso para prever a

resistência a oxacilina e podendo ser utilizado para confirmar resultados em isolados de *Staphylococcus* relacionados com infecções graves (Poulsen, Skov & Pollessen, 2003).

## **2.8. *Lactobacillus***

Neste ponto descreve-se um dos géneros de bactérias mais importantes no grupo das BAL e que foram objeto de estudo neste trabalho. Estas bactérias são utilizadas na conservação de produtos alimentares e respetivas matérias-primas. O género *Lactobacillus* engloba um número considerável de diferentes espécies que apresentam um certo grau de diversidade (*L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. brevis*, *L. fermentum*) (Fox, Guinee, Cogan & McSweeney, 2000). Entre estas o *Lactobacillus plantarum* é uma espécie versátil e flexível, encontrada numa variedade de nichos, e frequentemente no trato gastrointestinal humano e de outros animais. Estão envolvidas na elaboração de vários alimentos, tais como leites fermentados, queijos, vegetais fermentados e salames. Esses microrganismos causam a rápida acidificação da matéria-prima e produzem uma série de substâncias antimicrobianas, como por exemplo, ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico e ácido acético, reuterina, peróxido de hidrogénio, péptidos antifúngicos e bacteriocinas (Magnusson & Schnürer, 2001, Gálvez *et al.*, 2007). Dessa forma, aumentam a vida-de-prateleira e a segurança microbiológica, melhoram a textura e contribuem com o agradável perfil sensorial do produto final (Dicks *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2014). Este tipo de bactérias têm a capacidade de crescer em diferentes temperaturas e valores de pH, toleram oxigénio e diferentes concentrações de NaCl e nitrito, estas características fisiológicas são ideais em culturas *starter* para que seu uso não seja limitado pelas condições do processamento.

A necessidade de controlar bactérias patogênicas, principalmente a *Listeria monocytogenes* devido à sua capacidade de sobreviver em condições de baixo pH, é um grave problema na produção de produtos fermentados (Aymerich, Hugas, & Monfort, 1998; Johnson, Doyle, & Cassens, 1990; Steinhäuserova, Smola, & Stregnerova, 1998; Dicks *et al.*, 2004). Assim, não é de estranhar que nos últimos anos o foco tenha mudado para a seleção de culturas *starter* com a capacidade de produzir bacteriocinas, ou seja, proteínas ou complexos proteicos antagónicos às bactérias (Caplice & Fitzgerald, 1999; Hugas, 1999).

## **2.9. Bacteriocinas**

As bacteriocinas são definidas como um potente grupo anti-microbiano de péptidos ou proteínas ativos principalmente contra microrganismos estreitamente relacionados. Estes compostos são produzidos ao nível dos ribossomas bacterianos como metabólitos secundários (Hugas *et al.*, 1998; Gálvez *et al.*, 2007).

Na escolha de uma cultura *starter* produtora de bacteriocinas para a fermentação de produtos cárneos têm de ser considerados vários fatores, como a sua capacidade de multiplicação e

de produção de bacteriocinas no local original e na presença de NaCl, NaNO<sub>2</sub> e especiarias. É igualmente importante a difusão das bacteriocinas pela carne, a adsorção de lípidos e/ou proteínas e a sua inativação por enzimas proteolíticas (Holzapfel, Geisen, R., & Schillinger, 1995; Dicks *et al.*, 2004).

Foram definidas quatro classes de bacteriocinas para bactérias lácticas (Klaenhammer, 1993), que estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Descrição das bacteriocinas produzidos por BAL. (adaptado de Klaenhammer, 1993).

Classe	Dimensão	Descrição
I	Pequenas	Lantibióticos (péptidos com atividade antibiótica contendo lantionina) -são pequenos péptidos que foram diferenciadas de outras bacteriocinas pelo seu teor em desidro-aminoácidos e tioéter-aminoácidos.
II	< 10 KDa	Termoestáveis, não lantibióticos divididos em três subclasses, com base na sua sequência N-terminal característica, na formação de poros de dois componentes, ou na presença de um grupo funcional sulfidrílo.
III	> 30 KDa	Bacteriocinas instáveis ao calor, que incluem muitas enzimas extracelulares bacteriolíticas (hemolisinas e muramidases) que podem imitar as atividades fisiológicas das bacteriocinas.
IV	Diversos	Bacteriocinas complexas que contêm lípidos ou hidratos de carbono essenciais em adição às proteínas.

As bacteriocinas contêm diversas propriedades desejáveis para a conservação de alimentos, são geralmente reconhecidas como substâncias seguras (GRAS), são inativas e não tóxicas em células eucariotas, inativam-se por ação de proteases digestivas, normalmente toleram alterações de temperatura e pH, têm um espectro antimicrobiano relativamente vasto contra patógenos e bactérias deteriorativas de origem alimentar, normalmente atuam na membrana citoplasmática e os seus determinantes genéticos estão codificados em plasmídeos o que facilita a manipulação genética (Gálvez *et al.*, 2007).

Estudos levados a cabo nos últimos anos demonstram de modo claro que a utilização de bacteriocinas na conservação de alimentos pode trazer vários benefícios, podendo-se destacar o aumento do tempo de prateleira, o aumento de proteção em ambientes de temperaturas elevadas, a diminuição do risco de propagação de patógenos alimentares na cadeia alimentar, redução da aplicação de conservantes químicos, permitindo diminuir perdas económicas ao diminuir o desperdício alimentar (Gálvez *et al.*, 2007). Estudos recentes têm comprovado a existência de efeitos inibitórios de bacteriocinas produzidas por BAL relativamente à *Listeria monocytogenes* presente em produtos cárneos, como exemplo pode-se referir o uso de pediocina em carne fresca (Gao *et al.*, 2014).

### 3. Caracterização genética de *Staphylococcus*, e *Lactobacillus* isolados de produtos cárneos fermentados com capacidades tecnológicas e protetoras

#### 3.1. Objetivos

Este trabalho teve como principais objetivos: i) contribuir para a caracterização genotípica dos géneros *Staphylococcus* (*S. xylosus* e *S. equorum*) e *Lactobacillus* (*L. plantarum* e *L. sakei*) isolados de diversos produtos cárneos fermentados, em diferentes fases de produção e superfícies de diferentes ambientes fabris; ii) selecionar estirpes com características de segurança apropriadas nomeadamente isenção de resistências a antibióticos tais como penicilina e tetraciclina para serem utilizadas como *starters* na produção de produtos cárneos fermentados; iii) Analisar a ocorrência de genes estruturais que codifiquem a produção de bacteriocinas em *Lactobacillus*.

#### 3.2. Materiais e métodos

##### 3.2.1. Coleção de Isolados

Os estudo realizado neste trabalho experimental teve como base isolados de SCN, sendo 41 da espécie *Staphylococcus xylosus* e 17 da espécie *Staphylococcus equorum*, e isolados do género *Lactobacillus* sendo 71 da espécie *Lactobacillus plantarum* e 33 da espécie *Lactobacillus sakei* pertencendo à coleção existente no laboratório de tecnologia dos produtos de origem animal da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), da Universidade de Lisboa. Estes isolados foram obtidos a partir de amostras de diferentes produtos cárneos fermentados, cuja origem dos isolados e tipo de amostra recolhida estão descritas na tabela 2.

Tabela 2- Descrição da origem e recolha dos isolados em estudo.

Origem/Indústria	Produto/Superfície	Fase de Fabrico	Número de isolados
A	Chouriço de vinho, Chouriço de carne, Chouriço e Salsichão grosso	Massa inicial, Meio da cura e Produto final	43
B	Linguiça, Paio,	Massa inicial, Meio da cura, Produto final e Superfície	47
C	Linguiça	Meio da cura e Superfície	14
D	Chouriço	Meio da cura, Produto final e Superfície	17
E	Linguiça alentejana, Linguiça ibérica, Paio alentejano, Paio ibérico, Salsichão ibérico	Produto acabado	28
F	Linguiça	Meio da cura, Produto final e Superfície	13

A identificação dos isolados quanto à espécie tinha sido realizada previamente por técnicas de biologia molecular noutros trabalhos efetuados no mesmo laboratório.

Os isolados encontravam-se armazenados a -80°C em criotubos, contendo caldo de *Brain Heart Infusion* (BHI, Scharlau, S.L., Espanha) suplementado com 15 % de Glicerol (Merck, Alemanha), aquando do início do trabalho.

### **3.2.2. Identificação e caracterização Genotípica dos Isolados**

#### **3.2.2.1. Extração de ADN Cromossomal**

##### **3.2.2.1.1. Cultivo dos isolados para o Processo de Extração**

Para se realizar a extração de ADN dos isolados foi necessário revivificar previamente os mesmos, para tal foi efetuada sementeira em caldo de BHI (BHI Broth, Sharlau S.L.,Espanha) ou MRS (MRS Broth, Sharlau S.L.,Espanha) incubando-se a 30 ou 37°C de acordo com as condições ótimas de crescimento dos microrganismos, esta operação foi realizada duas vezes consecutivas. Posteriormente, os isolados do género *Staphylococcus* foram semeados em placas com meio Manitol Salt Agar (MSA, Scharlau, S.L., Espanha) suplementado com gema de ovo (Oxoid, Inglaterra) e incubados a 37°C, durante 24 horas em aerobiose. No caso dos isolados do género *Lactobacillus*, estes foram semeados em placas com meio Man Rogosa Sharpe 1,5% agar (MRS Agar, Sharlau S.L.,Espanha) e incubados a 30°C, durante cerca de 48 horas em anaerobiose promovida por um gerador (Genbox anaer, bioMérieux França).

##### **3.2.2.1.2. Extração de ADN**

A extração de ADN foi realizada de acordo com o método do Tiocianato de Guadinidina (adaptado de Pitcher *et al.*, 1989). Recolheu-se 2 a 3 ansas de cultura e suspendeu-se a cultura em 1 ml de tampão TE 1x. Centrifugou-se (Centrifuge 5415R, eppendorf AG,Alemanha) a suspensão a 8000 rpm, durante 10 min, a 4°C e descartou-se o sobrenadante. Em seguida ressuspenderam-se as células em 250 µl de TE 1x com lizozima (Applichem, Alemanha) e incubaram-se em banho-maria a 37°C, durante 2 horas. Posteriormente, adicionou-se 250 µl da solução de Tiocianato de Guanidina e colocou-se em gelo 10 min.. Adicionou-se 125 µl de Acetato de Amónio 10 M (Merck, Alemanha) e colocou-se novamente em gelo 10 min.. Adicionou-se de seguida 500 µl da mistura de Clorofórmio e Álcool Amílico numa proporção de 24:1). Centrifugou-se a 1300 rpm, durante 10 min., a 4°C recuperando-se o sobrenadante, a este adicionou-se 500 µl de Isopropanol (Sharlau, S.L., Espanha), efetuou-se nova centrifugação a 1300 rpm, rejeitando-se o sobrenadante. Após lavagem do *pellet* com 500 µl de Etanol a 70%, centrifugou-se novamente e deixou-se evaporar. Após a adição de 150 µl de TE 1x, o armazenamento foi efetuado a 4°C.

### 3.2.2.2. Procedimentos de PCR

#### 3.2.2.2.1. PCR *Fingerprinting*/Tipificação Genómica

A tipificação genómica dos isolados em estudo efetuou-se utilizando o método PCR *Fingerprinting* que teve como base a descrição feita por Versalovic, Schneider, Bruijn & Lupski (1994). Esta reação realizou-se para todos os isolados deste estudo. Foram utilizados como *primers* de repetição, com a capacidade de hibridar (annealing) em várias zonas, o M13 e o OPC19 (STAB Vida, Portugal) descritos na Tabela 3 em reações individuais, permitindo pela análise do perfil obtido ter uma ideia aproximada de como os isolados se relacionam entre si. Quanto maior for a semelhança do perfil de ADN dos isolados, maior é a probabilidade de estes se relacionarem.

Tabela 3- *Primers* utilizados na reação PCR *Fingerprinting*.

Denominação do primer	Sequência do primer
M13	5'- GAGGGTGGCGGTTCT-3'
OPC19	5'-GTTGCCAGCC-3'

As reações foram realizadas num volume total de 25 µl, utilizando-se 2,5 µl de Tampão 1x (10x Reaction Buffer), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de mix dNTP's (dNTP set 100 mM Nzytech, Portugal), 2 mM de *primer* e 0.2 U/µl de Taq Polimerase (NzyTaq DNA Polymerase). A amplificação de ADN foi efetuada no termociclador VWR Dpio (VRW, Bélgica), seguindo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, 40 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturação), 2 min a 40°C (annealing) e 2 min a 72°C (extensão); a finalização foi realizada a 72°C durante 10 min e o armazenamento a 4°C. Como controlo da reação de PCR realizaram-se duplicados dos produtos de PCR de alguns isolados.

A revelação dos produtos de PCR foi realizada através da técnica de eletroforese. Sendo 5 µl de produto de PCR, ao qual foi previamente adicionado 2 µl de Azul de Bromofenol (6x) (USB Corporation, USA) e 2 µL de Gel Red (20x) (Nucleic Staining Acid Solution, iNtRON Biotechnology, Coreia) colocado em gel de agarose (SeaKem LE Agarose, Lonza, USA) a 1,5% com TBE 1X.

A corrida de eletroforese decorreu em TBE 1X a uma voltagem constante de 120V, durante 1h15min, numa tina específica (VWR, USA), em seguida os géis foram observados e fotografados num transiluminador de UV (ImageMaster, Pharmacia Biotech).

#### 3.2.2.2.2. PCR para a deteção de genes envolvidos na produção de plantaricinas para *Lactobacillus plantarum*

De modo a detetar a presença dos genes envolvidos na produção de bacteriocinas em *Lactobacillus* foi utilizado um método adaptado de Remiger *et al.* (1996) e Sáenz *et al.* (2009). Neste protocolo realizou-se um *multiplex* (com os primers PlnA,B,C,N e K) enquanto que os

restantes foram PCRs *simplex* nos quais estiveram envolvidos os *primers* descritos na Tabela 4.

Tabela 4-*Primers* e condições utilizados na reação de PCR para a detecção de genes do locus *pln* amplificados por PCR classificados em operações.

	Denominação do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i> (5'→3')	Amplicons (pb)	Temperatura de annealing (°C)
PlnA	PlnA-F	GTA CAG TAC TAA TGG GAG	450	53,5
	PlnA-R	CTT ACG CCA TCT ATA CG		
PlnB	PlnB-F	GCT TCT TAT TTA AGT AGA GGA	927	53,5
	PlnB-R	GCC ACG ATT ACT ACC CTT AG		
PlnC	PlnC-F	AGC AGA TGA AAT TCG GCA G	108	53,5
	PlnC-R	ATA ATC CAA CGG TGC AAT CC		
PlnK	PlnK-F	CTG TAA GCA TTG CTA ACC AAT	246	53,5
	PlnK-R	ACT GCT GAC GCT GAA AAG		
PlnN	PlnN-F	ATT GCC GGG TTA GGT ATC G	146	53,5
	PlnN-R	CCT AAA CCA TGC CAT GCA C		
PlnR	PlnR-F	CCC AGC AGT CCC ATC ACT AA	236	56,5
	PlnR-R	TTA CGG AGC GGC ATC TAT		
PlnL	PlnL-F	ACG GCG TCT GAG ATC CAA TG	413	56,5
	PlnL-R	GTT CTG GAA GTC ACT GCG		
PlnJ	PlnJ-F	TAA CGA CGG ATT GCT CTG	475	53,5
	PlnJ-R	AAT CAA GGA ATT ATC ACA TTA		
PlnM	PlnM-F	AAG CGG TAT ATT AAA AGC GTA	444	54
	PlnM-R	CAT TTC CTC CTT AAA GCA TTC		
PlnD	PlnD-F	TGA GGA CAA ACA GAC TGG AC	414	54
	PlnD-R	GCA TCG GAA AAA TTG CGG		

A reação de PCR foi realizada num volume total de 25 µl utilizando-se 2,5 µl de Tampão 1x (10x Reaction Buffer), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de mix dNTP's (dNTP set 100 mM Nzytech, Portugal), 10 pmol/µl de cada *primer* e 0.5 U/µl de Taq Polimerase (NzyTaq DNA Polymerase). A amplificação foi realizada no termociclador VWR Dopio (VRW, Bélgica).

Como controlo positivo foi utilizada a estirpe de referência *Lactobacillus plantarum* ATCC® BAA793™. A revelação dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese e procedeu-se como descrito anteriormente em 3.2.3.1.

### 3.2.2.2.3. PCR para a detecção de genes envolvidos na produção de sakacinas para *Lactobacillus sakei*

De modo a detetar a presença dos genes envolvidos na produção de sakacinas em *Lactobacillus* foi utilizado um método adaptado de Remiger *et al.* (1996) e Cocolin & Rantsiou (2007). Neste protocolo estiveram envolvidos os *primers* descritos na tabela 5.



Tabela 5 - *Primers* e condições utilizados na reação de PCR para a detecção de genes de sacacinas.

	Denominação do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i> (5'→3')	Amplicons (pb)	Temperatura de annealing (°C)
SakA	SakA-F	GTA AAA GAA TTA AGT ATG	171	50
	SakA-R	TTA CAT TCC AGC TAA ACC		
SakP	SakP-F	ATG GAA AAG TTT ATT GAA	200	47
	SakP-R	TTA TTT ATT CCA GCC AGC		
SakQ	SakQ-F	ATG CAA AAT ACA AAA GAA	200	49
	SakQ-R	CGC TTG TTT AGA GAC ACC		

A reação de PCR procedeu-se como descrito no ponto 3.2.2.2.2. A amplificação foi realizada no termociclador VWR Dpio (VRW, Bélgica).

Como controlo positivo foi utilizada a estirpe de referência *Lactobacillus curvatus* ATCC® 51436™. A revelação dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese e procedeu-se como descrito anteriormente em 3.2.3.1.

#### 3.2.2.2.4. PCR de Detecção de presença dos genes de resistência *tet's* (M), (L) e (K)

A detecção da presença dos genes de resistência à Tetraciclina *tet's*(M), (L) e (K) nos isolado do género *Staphylococcus* foi realizada de acordo com o método descrito por *Genvers, Danielsen, Hyus e Swings* (2003). Neste protocolo foram envolvidos os *primers* descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - *Primers* utilizados no PCR de detecção de presença das *tet's*(M), (L) e (K).

	Denominação do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>
tet(M)	TetM1	5'-AGT GGA GCG ATT ACA GAA-3'
	TetM2	5'-CAT ATG TCC TGG CGT GTC TA-3'
tet(K)	TetK1	5'-GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT-3'
	TetK2	5'-GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA-3'
tet(L)	TetL-FW 3	5'-GTMGTTGCGCGCTATATTCC-3'
	TetL-RV 3	5'-GTGAAMGRWAGCCACCTAA-3'

A reação de PCR foi realizada num volume total de 25 µl, utilizando-se 2,5 µl de Tampão 1x (10x Reaction Buffer), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de mix dNTP's (dNTP set 100 mM Nzytech, Portugal), 20 pmol/µl de cada *primer* e 0.5 U/µl de Taq Polimerase (NzyTaq DNA Polymerase). A amplificação foi realizada no termociclador VWR Dpio (VRW, Bélgica), seguindo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, 30 ciclos de 1 min. a 94°C (desnaturação), 1 min. a 55°C (annealing) e 2 min. a 72°C (extensão), a finalização foi realizada a 72°C durante 10 min. e o armazenamento a 4°C. Os amplicons produzidos foram de aproximadamente 158 pb (tet(M)), 360 pb (tet(K)) e 696 pb (tet(L)). Como controlos positivos foram utilizadas as estirpes de referência *S.aureus* Pr7/08 (tet(M), tet(K)) e *S.aureus* 124.1(tet(M), tet(L)). A revelação dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese e procedeu-se como descrito anteriormente.

### **3.2.2.3. Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)**

O PFGE é uma técnica usada para gerar um *fingerprinting* de ADN de um isolado bacteriano, adaptada de Chung *et al.* (2000) e Khanh *et al.* (2010).

O PFGE permitir caracterizar o genoma bacteriano ao separar vários fragmentos de grande dimensão, resultantes da lise de DNA efetuada por enzimas de restrição, utilizando um campo elétrico que muda constantemente de direção. Esta técnica foi aplicada a isolados de *Staphylococcus*, representantes dos principais grupos obtidos por PCR- *fingerprinting*.

Este procedimento decorre durante cerca de 6 dias, inicialmente amplifica-se por cultivo em meio de cultura as bactérias que se multiplicam em condições apropriadas, de seguida são suspensas em tampão TEN (NaCl 1M; Tris base 10mM; EDTA 10 mM; H<sub>2</sub>O mQ) refrigerado de modo a apresentarem uma densidade de 6-7 MacFarland. Após os passos iniciais a suspensão de bactérias são suspensas numa solução de agarose (Agarose prep, GE Healthcare, England), quando esta polimeriza procede-se ao corte em forma de disco, num passo seguinte dá-se a lise celular para libertar o ADN por adição de solução de lisostafina (50 µg/ml) e de lisozima (1 mg/ml), seguindo-se a desproteínização, em que se adiciona solução ES (EDTA 0,5M; Sarkosyl 1%; H<sub>2</sub>O mQ) e proteínase K.

A fase seguinte passa por lavar os discos com tampão TE 1x (seis vezes) para remover a proteínase K e por último procede-se à digestão do ADN com o auxílio de enzimas de restrição, nomeadamente a SmaI de acordo com o protocolo descrito pela Biolabs (New England), que corta o ADN bacteriano em determinados locais.

Os discos tratados são então colocados num gel de agarose (SeaKem Gold Agarose, Lonza, USA) e os fragmentos de restrição são separados com base no seu tamanho por ação de um campo elétrico pulsátil. As condições de corrida definidas neste trabalho foram: temperatura (11,5 °C), tensão (200V), tempo inicial de pulso (5 seg), tempo final (35 seg) e tempo total da corrida (23h). Corou-se o gel em banho de brometo de etídio (10 mg em 1L de água) cerca de 20-30 min e fotografou-se o mesmo num transiluminador de UV (ImageMaster, Pharmacia Biotech).

## **3.2.3. Testes De Expressão Fenotípica**

### **3.2.3.1. Teste de Sensibilidade a Antibióticos**

Alguns dos isolados de *Staphylococcus* apresentaram em estudo prévio elevada resistência à penicilina (Gonçalves E., 2013), neste trabalho averiguou-se a possibilidade de serem *Methicillin Resistant Staphylococcus* (MRS). Estes isolados foram submetidos a testes de sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão em disco. Para tal, transferiu-se 4 a 6 colónias de cada um dos isolados crescidos em MSA, para o meio Triptona Soja Agar (TSA, Scharlau S.L, Espanha) e incubou-se a 37 °C durante 24 horas. O inóculo foi diluído em soluto fisiológico estéril, até obter uma concentração equivalente a 0,5 na escala MacFarland. A

suspensão dos isolados a testar foi semeada de forma homogénea em meio Muller-Hinton Agar (Scharlau S.L, Espanha), foram então colocados os discos contendo, Penicilina G (10 UI) e Oxacilina (1 µg).

As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e observou-se a formação de halos de inibição, os quais foram medidos em milímetros registando-se os diâmetros dos halos formados para cada antibiótico em cada um dos isolados testados. Os resultados obtidos foram classificados em resistentes ou sensíveis de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Na Tabela 7 encontram-se listados os grupos de antibióticos com as respectivas concentrações dos discos utilizados e sua categorização em relação a suscetibilidade, como controlo foram usadas as estirpes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e o *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Tabela 7 - Lista dos antibióticos em testes, respetivas concentrações e *cutoff points* utilizados como critério de classificação da suscetibilidade.

Classe	Antibiótico	Abreviatura	Concentração do disco	Resistente (mm)	Sensível (mm)
Penicilinas	Penicilina	P	10 UI	≤ 28	≥ 29
	Oxacilina	OX	1 µg	< 21	≥ 21

CLSI, (2013)

### 3.2.3.2. Caracterização Proteómica

#### 3.2.3.2.1. Extração de Proteínas Totais (SDS-PAGE)

Pretendeu-se verificar se as proteínas totais no isolado *Lactobacillus plantarum* P3B7 sofriam alterações quando este foi cultivado em diferentes condições nomeadamente: em placa MRS agar durante 48h; em caldo BHI durante 24h e 48h; em caldo BHI com cultura esterilizada de *Listeria monocytogenes* CECT937 durante 24h e 48h; em caldo MRS durante 48h; e em caldo MRS com cultura esterilizada de *Listeria monocytogenes* CECT937 durante 48h. A utilização dos diferentes meios de cultura, teve como propósito sujeitar o isolado a diferentes ambientes nutritivos, uma vez que o BHI é mais pobre em nutrientes do que o MRS. A esterilização da *Listeria monocytogenes* CECT937 teve como intuito colocar a estirpe P3B7 em contacto direto com restos celulares de *Listeria monocytogenes* com o objetivo de induzir a possível produção de bacteriocinas, sendo que o patogénico apesar de se encontrar inativado possui proteínas estruturais específicas que possibilitam o seu reconhecimento por parte da estirpe P3B7 e poderão eventualmente potenciar a produção de bacteriocinas.

A lise celular e extração de proteínas foi realizada através da utilização de ultra-sons (sonicação). Na extração por sonicação os *pellets* bacterianos foram ressuspensos em água ultrapura esterilizada, sendo a suspensão celular submetida a ciclos de 30s de sonicação no aparelho *Bandelin electronic* UW 2070 (9x10%, power 90%). As amostras foram sempre mantidas em gelo para evitar o seu sobre-aquecimento. De seguida, os extratos foram

agitados durante 1 h na incubadora de agitação 222DS *Benchtop Shaking Incubator* (200 r.p.m, 25°C), centrifugados a 13 200 r.p.m. e conservados a -20°C até serem utilizados.

Os extratos proteicos totais foram analisados por eletroforese em gel SDS-PAGE (dodecilsulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE)), tendo sido separados no aparelho Xcell4 SureLock™ Midi-Cell; todos os reagentes utilizados pertencem à marca *Invitrogen Life Technologies*, Estados Unidos de América.

As amostras foram preparadas num volume final de 20 µL contendo: 5 µL de LDS (dodecilsulfato de lítio) *tampão* 4X (106 mM Tris HCl; 141 mM Tris Base; 2% LDS; 10% Glicerol; 0,51 mM EDTA; 0,22 mM SERVA Blue G250; 0,175 mM Vermelho de fenol (Phenol Red); pH 8,5); 2 µL agente redutor (reducing agent) 10X (500 mM DTT) e 13 µL de extrato proteico. De seguida, a mistura foi aquecida durante 10 min a 70°C na placa térmica e colocada em gelo.

A eletroforese realizou-se em géis NuPAGE®NOVEX® 4-12% Bis-Tris em *tampão* MES SDS 1X (850 mM MES (ácido 2-(*N*-morfolino) etano sulfónico); 50 mM Tris Base; 0,1% SDS; 1 mM EDTA; pH 7,3) e decorreu durante 55 min a uma voltagem constante de 200 volts, utilizando o marcador BenchMark™ *Protein Ladder*.

Após eletroforese os géis foram retirados dos moldes e efetuou-se a coloração dos mesmos utilizando o corante *SimplyBlue™ SafeStain*, seguindo as instruções do fabricante. No final do procedimento o gel foi mantido em corante durante aproximadamente 16±2h à temperatura ambiente e passado esse período procedeu-se à descoloração, que consistiu em retirar o corante e lavar duas vezes em água ultrapura (aquecendo no micro-ondas), de seguida os géis foram fotografados no *Pharmacia Biotech, ImageMaster®*.

### 3.2.4. Análise estatística

Os perfis genéticos dos isolados resultantes do PCR *Fingerprinting*, foram analisados através do programa informático *Bionumerics Applied Math* (versão 6.6, Bélgica). Obtiveram-se dendrogramas de similaridade dos isolados, os quais foram construídos recorrendo ao coeficiente de correlação de *Pearson*, com uma otimização de 1,5%, e uma tolerância de correspondência das bandas de 1,5%, pelo método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA: Unweighted Pair Groups using Arithmetic averages).

Foi calculado o índice de simpson's (Hunter & Gaston,1998), de modo a termos uma noção da diversidade intraespécie para cada um dos dendrogramas, através da fórmula:

$$D = \frac{\sum_{i=1}^s n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Em que  $s$  é o número de grupos estabelecidos,  $n_1$  é o número de isolados por grupo e  $N$  é o número total de isolados. O índice de Simpson ( $D$ ) é uma medida de diversidade, que essencialmente mede a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso pertencerem à mesma espécie. O valor de  $D$  varia de 0 a 1, 0 representa a diversidade é infinita e 1 que não existe diversidade, ou seja, quanto maior o valor menor é a diversidade.

Com o mesmo programa informático foi também feita a análise dos perfis genéticos em conjunto com os perfis fenotípicos e os caracteres genéticos. Inicialmente os resultados foram tratados em separado, depois conjugou-se os dados através da média (average from experiments) e com o método de aglomeração UPGMA.

A análise dos resultados obtidos pela técnica do PFGE, foi também realizada através do programa informático previamente mencionado, utilizando-se o coeficiente de correlação de *Dice* com uma otimização de 1,5%, com uma tolerância de correspondência das bandas de 1,5%, pelo método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA).

## 4. Resultados

### 4.1. PCR *Fingerprinting*/Tipificação

Uma elevada variedade de métodos moleculares de tipificação genómica têm sido utilizados para a identificação e/ou diferenciação de microrganismos, devido a simplicidade de execução que apresentam, rapidez na obtenção de resultados e pelo facto de poderem ser utilizados em qualquer organismo, independentemente da sua origem, complexidade ou sequência do genoma da espécie. Podendo-se destacar a técnica REP-PCR (*repetitive element*), em que se recorre à utilização de *primers* dirigidos para sequências existentes e repetidas em diferentes regiões do cromossoma bacteriano. REP-PCR inclui, por exemplo, as sequências ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), M13 (derivada da sequência “core” do bacteriófago M13), REP (*repetitive extragenic palindrome*) e OPC-19. O princípio é a criação da “impressão digital” do microrganismo daí a designação genérica de PCR-*fingerprinting*. Permitem ainda a deteção de polimorfismos que irão ajudar na comparação de microrganismos filogeneticamente próximos. Nas técnicas de PCR-*fingerprinting* é utilizado um único *primer* que pode hibridar em várias regiões do genoma, contrariamente às reações de PCR convencionais em que são utilizados dois *primers* específicos que flanqueiam uma região única a amplificar (Welsh e McClelland, 1990; Vos *et al.*, 1995; Szczuka e Kaznowski, 2004; Švec *et al.*, 2005; Pablos *et al.*, 2011).

A temperatura de hibridação utilizada na técnica de PCR-*fingerprinting* é suficientemente baixa de modo a permitir que o *primer* hibride com o DNA molde mesmo não existindo homologia total entre ambos. O número de cópias de cada sequência depende da eficiência com que o *primer* se liga a esta, isto porque o grau de homologia entre o *primer* e DNA alvo

podem variar. Estas características possibilitam a utilização desta técnica em qualquer DNA alvo, já que não existe necessidade de conhecimento prévio do genoma em estudo. No entanto as baixas condições restritivas de PCR, provocadas pela pequena dimensão do *primer* e baixa temperatura de hibridação tornam estas técnicas muito sensíveis a fatores externos (ex. pequenas oscilações de temperatura, variações na razão DNA/*primers*, refletindo-se numa baixa reprodutibilidade (Szczyka & Kaznowski, 2004)).

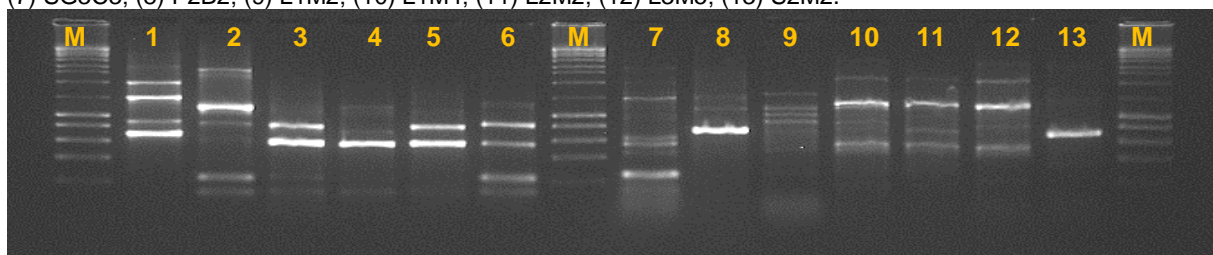
A fim de alcançar um maior poder discriminante no presente trabalho utilizaram-se dois *primers* distintos para tipificação genómica dos isolados, M13 e OPC-19.

#### 4.1.1. PCR fingerprinting - Género *Staphylococcus*

Procedeu-se à realização da técnica de PCR *Fingerprinting* descrita no tópico 3.2.3.2, de todos os isolados pertencentes ao género *Staphylococcus*. Na Figura 1 pode-se observar como exemplo uma das fotografias de eletroforeses realizadas com isolados de *Staphylococcus xylosus*.

Figura 1 - PCR *Fingerprinting* com o *primer* de repetição OPC-19, de isolados de *Staphylococcus xylosus*.

Linhas: (M) Marcador de 200 a 10000 pb; (1) P1B6; (2) CV1C2; (3) SG3C4; (4) SG3C5; (5) SG3C6; (6) CH3C2; (7) SG3C3; (8) P2B2; (9) L1M2; (10) L1M4; (11) L2M2; (12) L3M5; (13) S2M2.



Após amplificação e separação dos produtos em gel de agarose a análise de semelhança genética foi efetuada através de um *software* denominado *Bionumerics Applied Math*. Os dendrogramas construídos com a compilação dos perfis obtidos com a utilização dos dois *primers* [M13 e OPC-19] podem observar-se no Anexo nas Figuras a e b.

Na Figura a encontra-se representado o dendrograma para *Staphylococcus xylosus*, para o nível de semelhança traçado (60%), observou-se a divisão dos isolados em 10 grupos. Pode-se referir que existe uma vasta variedade genética e uma baixa similaridade; cada grupo tem entre 1 e 21 isolados; o 1º, 5º e 7º grupos contém isolados da indústria B; o 2º, 3º 6º e 8º grupos são constituídos por um único isolado e possuem similaridades baixas que variam entre os 45% e 57,6%; o 4º e maior grupo possui similaridades que variam entre os 68,7% e os 96,8% e contém isolados maioritariamente da indústria B com exceção de 6 isolados que são da C; o 5º grupo possui similaridades que variam entre os 64,7 e 87,5%; o 9º grupo é atípico pois os isolados provêm de indústrias distintas; o 10º grupo contém isolados da indústria C; os isolados são na sua maioria provenientes da indústria B. Apesar da vasta variedade genética

existe uma relação genética entre os isolados do produto e do meio ambiente envolvente da indústria (ex: isolados L1B4 e S3B2 pertencentes ao 4º grupo cujo nível de similaridade é de 96,1%). Novamente salienta-se a elevada diversidade de perfis de *Fingerprinting* encontrada no grupo de isolados da espécie *Staphylococcus xylosus* traduzida por um índice de *Simpson's* de 0,28 (28%).

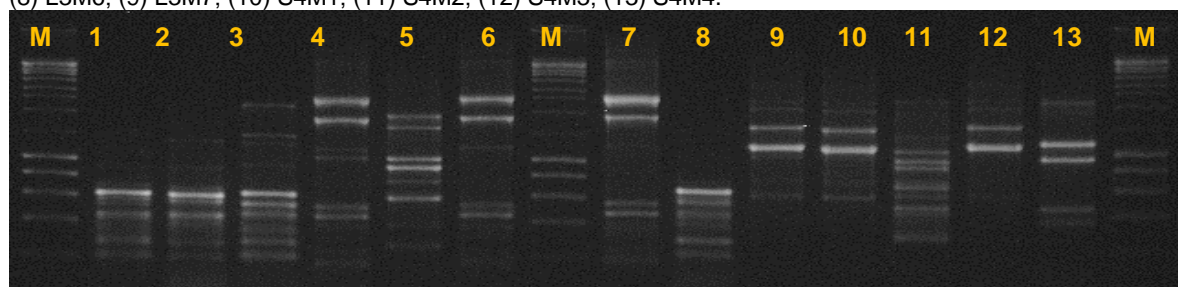
Na Figura b encontra-se representado o dendrograma para *Staphylococcus equorum*, para o nível de semelhança traçado (60%), observou-se a divisão dos isolados em 5 grupos. Pode-se referir que existe uma vasta variedade genética e uma baixa similaridade que varia entre 21,1% e 91,7%; cada grupo tem entre 1 e 6 isolados; o 2º grupo é constituído por um único isolado e possui um nível de similaridade baixa de 21,1%; os isolados são na sua maioria proveniente da indústria A, a restante minoria provêm da B. Novamente salienta-se a elevada diversidade de perfis de *Fingerprinting* encontrada no grupo de isolados da espécie *Staphylococcus equorum* traduzida por um índice de *Simpson's* de 0,21 (21%)

Estabeleceu-se ainda que os isolados com mais de 90% poderiam considerar-se clones da mesma estirpe com o mesmo perfil genético.

#### 4.1.2. PCR fingerprinting - Género *Lactobacillus*

Procedeu-se à realização da técnica de PCR *Fingerprinting* descrita no tópico 3.2.3.2, de todos os isolados pertencentes ao género *Lactobacillus*, na Figura 2 podemos observar a fotografia de uma das eletroforeses realizadas.

Figura 2 - PCR *Fingerprinting* com o *primer* de repetição M13, de isolados de *Lactobacillus*.  
Linhas: (M) Marcador de 200 a 10000 pb; (1) L1B1; (2) L1B3; (3) L2M5; (4) L2M7; (5) L2M8; (6) L3M1; (7) L3M2; (8) L3M6; (9) L3M7; (10) S4M1; (11) S4M2; (12) S4M3; (13) S4M4.



Os dendrogramas construídos com a compilação dos perfis obtidos com a utilização dos dois *primers* [M13 e OPC-19] podem observar-se no Anexo A nas Figuras c e d.

Na Figura c encontra-se representado o dendrograma para *Lactobacillus plantarum*, para o nível de semelhança traçado (60%), observou-se a divisão dos isolados em 30 grupos. Pode-se referir que existe uma vasta diversidade genética dada a baixa similaridade observada que varia entre 37,3% e 99%; cada grupo tem entre 1 e 8 isolados; o 7º, 10º, 12º, 14º, 17º, 18º, 20º, 26º, 28º, 29º e 30º grupos são constituídos por um único isolado e possuem similaridades baixas que variam entre 37,3% e 59,2%; o 1º grupo divide-se em 2 grupos de isolados,

provenientes de Serpa e de Barrancos; no 11º grupo os isolados podem ser considerados clones pois têm uma similaridade entre 89,9% e 99%; no 8º grupo podemos observar a existência de uma relação genética entre os isolados do produto e do meio ambiente envolvente da indústria (L1B3 e S1B8 -72,9%). Contudo salienta-se a elevada diversidade de perfis de *Fingerprinting* encontrada no grupo de isolados da espécie *Lactobacillus plantarum* traduzida por um índice de *Simpson's* de 0,04 (4%).

Na Figura d encontra-se representado o dendrograma para *Lactobacillus sakei*, para o nível de semelhança traçado (60%), observou-se a divisão dos isolados em 6 grupos.

Pode-se referir que cada grupo tem entre 1 e 24 isolados; o 1º e maior grupo possui isolados que provêm maioritariamente de indústrias de Barrancos e Mértola, cuja similaridade varia entre 64,6% e 96,6%; o 2º e 4º grupos são constituídos por um único isolado e possuem similaridades de 59,8% e 51,5%, respetivamente; o 3º grupo possui 2 isolados provenientes de Barrancos com 76,5% de similaridade e 1 isolados de Serpa; o 5º e 6º grupos têm apenas isolados da indústria de Barrancos. Contudo salienta-se a elevada diversidade de perfis de *Fingerprinting* encontrada no grupo de isolados da espécie *Lactobacillus sakei* traduzida por um índice de *Simpson's* de 0,53 (53%).

#### **4.2. Detecção de genes envolvidos na produção de plantaricinas para *Lactobacillus plantarum***

Esta deteção foi realizada por PCR, para 10 genes do locus *pln* (A,B,C,D,N,K,R,L,J e M).

Ao efetuar a pesquisa de genes envolvidos na produção de plantaricinas específicas dos *Lactobacillus plantarum*, destacou-se de forma positiva o isolado P3B7, que apresentou todos os genes em estudo. A maioria dos isolados apresentou pelo menos um gene, no entanto uma porção de isolados verificaram-se isentos de qualquer gene em destaque nesta fase do estudo, 5 são originários da industria F (S4M2,S4M4,S4M8,S4M1 e S4M7), 4 da A (SG2C6, SG3C7, CV3C6 e CV3C5) e das industrias B e E, S4B6 e 2L3-4, respetivamente. Na Figura 3 observa-se a análise comparativa entre o *fingerprinting* e a presença ou ausência dos genes envolvidos na produção de bacteriocinas.

Dos 71 isolados em estudos, 76,06% apresentaram o gene *plnC* fazendo deste o mais frequente, 69,01% o gene *plnN*, 61,97% o gene *plnR*, 47,89% o gene *plnK*, 46,48% o gene *plnL*, 33,80% o gene *plnM*, 32,40% o gene *plnB*, 28,17% o gene *plnD*, 23,94% o gene *plnJ* e por último o gene menos frequente *plnA*, presente em 19,72% dos isolados.

Contudo é de referir que existe uma vasta variedade genética observável através dos baixos valores de similaridade entre isolados, mesmo verificando-se agrupamentos de isolados provenientes da mesma indústria.



Phylogenetic tree and heatmaps showing the relationship between *staphFMV+UE* (Y-axis) and *Bacteriocinas(genes)* (X-axis). The tree is rooted at 100% bootstrap support. The heatmaps show the presence (black) or absence (white) of specific bacteriocin genes across the samples.

**Phylogenetic Tree (Left):** The tree is rooted at 100% bootstrap support. The Y-axis is labeled *staphFMV+UE*. The tree shows a clear clustering of samples into two main groups: a large cluster of *Staphylococcus aureus* (top) and a smaller cluster of *Staphylococcus epidermidis* (bottom). The *S. aureus* cluster is further divided into several sub-clusters, including those associated with the *staphFMV+UE* and *staphFMV+UE* groups.

**Heatmaps (Middle):** The heatmaps show the presence (black) or absence (white) of specific bacteriocin genes across the samples. The X-axis is labeled *Bacteriocinas(genes)*. The genes are: PhtA, PhtB, PhtC, PhtD, PhtN, PhtK, PhtJ, PhtM, PhtR, and PhtL. The heatmaps show that the *staphFMV+UE* group (top) is generally positive for PhtA, PhtB, PhtC, PhtD, PhtN, PhtK, PhtJ, PhtM, PhtR, and PhtL. The *staphFMV+UE* group (bottom) is generally negative for PhtA, PhtB, PhtC, PhtD, PhtN, PhtK, PhtJ, PhtM, PhtR, and PhtL.

**Legend (Right):** The legend identifies the samples and their associated bacteriocin genes. The samples are: P05-89 A, L3M7, C3C1, 13S1-8, Cv2C7, SG2C6, Cv3C8, Cv2C6, Cv3C7, P3B1, 1L3-5, 2L2-6, 1L2-7, 2L2-8, L3M1, Cv3C6, C3C4, P05-35, 1L2-1, P05-29, P05-42, Cv2C1, P05-102, 19P1-7, 2L3-1, P2B8, SG2C3, 1L2-2, 1L2-6, Cv2C2, 2L3-3, S1B8, P05-67, 2L3-4, 20P2-1, L1B3, Cv3C5, 13S1-6, S4M3, P05-57, P05-62, P05-119, S4M2, S4M4, S4M8, S4M1, S4M7, S4B6, L1B1, L2M8, 19P2-5, P2B5, L3M2, L3M6, L2M5, L2M7, P05-27, P05-28, P05-54, P05-6, P2B2, S3M3, 2L2-4, P3B8, S4B8, P3B7, P05-4, SG3C7, P05-38, P05-45, and P05-39.

#### **4.3. Deteção de genes envolvidos na produção de sacacinas para *Lactobacillus sakei***

A deteção de genes envolvidos na produção de sacacinas foi realizada por PCR para os genes *sakA*, *sakP* e *sakQ*.

Ao efetuar a pesquisa de genes envolvidos na produção de sacacinas, específicas dos *Lactobacillus sakei*, verificou-se que nenhum dos isolados estudados apresentou o gene *sakA*, na maioria dos isolados os genes estão ausentes. No entanto destacaram-se 3 isolados provenientes da indústria B, L1B8, P2B3 (que no *fingerprinting* apresentaram níveis de semelhança superiores a 90% podendo assim ser considerados clones) e L3B8 que são positivos para os genes *sakP* e *Q*.

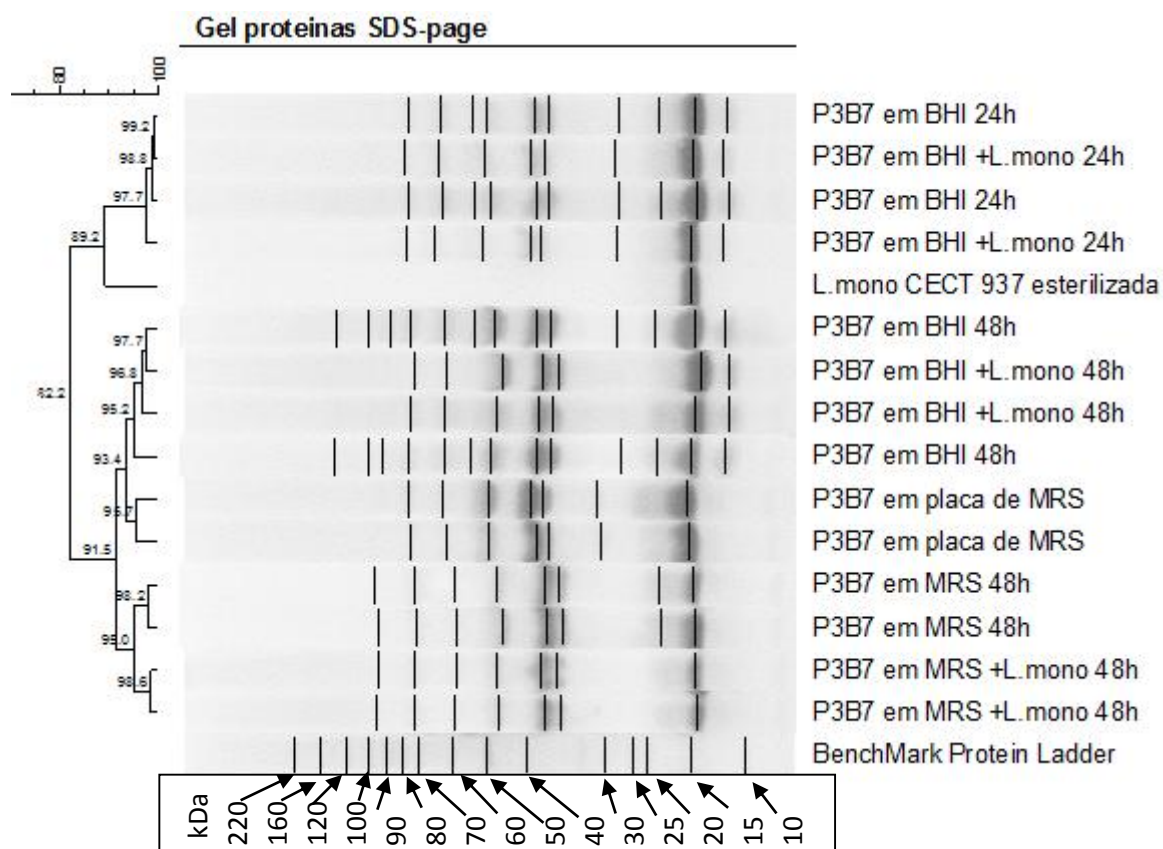
#### **4.4. Proteínas totais**

São várias as metodologias aplicadas na lise celular durante a preparação de extratos proteicos totais, podendo-se destacar o tratamento ultrassónicos (sonicação), com lisozima ou com SDS (sulfato dodecil de sódio) (Walker, 1986; Dijkshoorn, 2001; Gumber *et al.*, 2007). Optou-se pela extração por sonicação pelo facto de os perfis proteicos obtidos serem mais perceptíveis e “limpos de ruído de fundo”.

Uma vez que o *L. plantarum* P3B7 se destacou por apresentar todos os genes estudados no presente trabalho envolvidos na produção de plantaricinas, pretendeu-se verificar se as suas proteínas totais sofriam alterações quando sujeito a stress nutritivo e/ou competitivo.

De modo a permitir uma melhor visualização do gel SDS-PAGE, tratou-se a imagem através do programa informático *Bionumerics Applied Math*, como se pode observar na Figura 4.

Figura 4 - Perfis SDS-PAGES em diferentes condições.



Observam-se uma maior quantidade de bandas (frações proteicas) quando o isolado cresce em meio BHI do que em meio MRS, com destaque para as 48h de crescimento sem a presença de *L. monocytogenes*, tal pode dever-se á escassez de nutrientes. A banda dos 10 kDa só ocorre quando estamos na presença de meio BHI.

A banda de aproximadamente 15 kDa está presente em todos os casos, mesmo na *L. monocytogenes* esterilizada, o que leva a supor que represente proteínas de membrana das bactérias apresentadas. Do mesmo modo as duas bandas que se encontram imediatamente abaixo dos 40 kDa observam-se em todas as situações em que o P3B7 está presente.

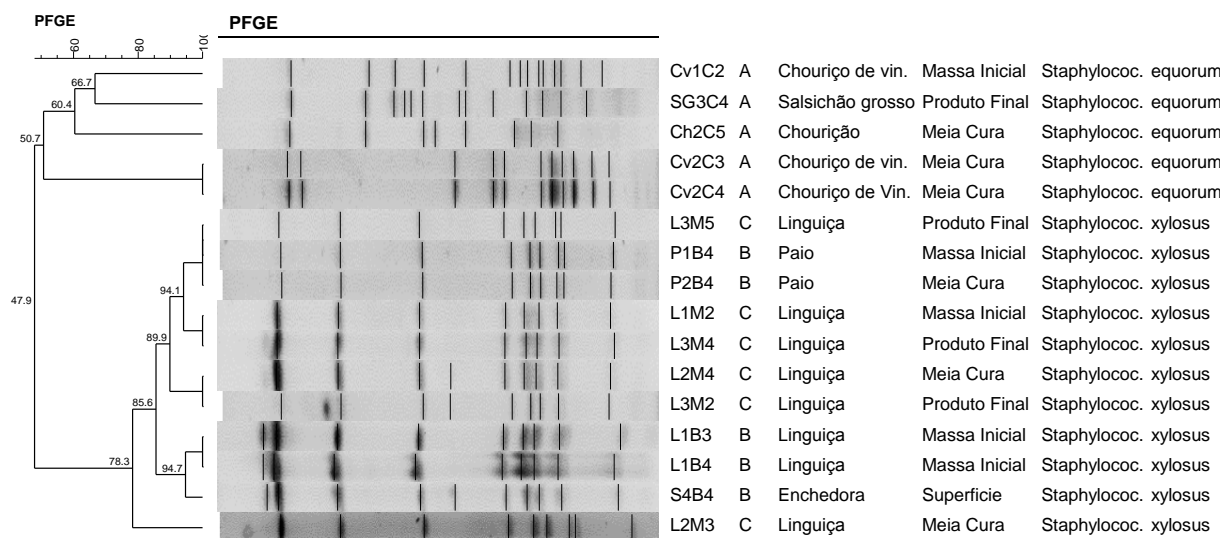
Quando o P3B7 cresce em meio MRS, verifica-se que os perfis sofrem menos alterações, no entanto é de notar a presença da banda de 30 kDa quando o isolado cresce em placa, da banda de aproximadamente 95 kDa quando o isolado cresce em caldo MRS na presença de *L. monocytogenes* e a dos 20 kDa quando o isolado cresce em caldo MRS. É de notar que a banda de 20 kDa mencionada anteriormente só é visível na ausência de *L. monocytogenes*. Estas alterações no perfil de proteínas obtido podem estar relacionadas com uma possível resposta do isolado quando na presença de *L. monocytogenes* CECT 937 inativada. E fornecem ainda evidências de que talvez se produzam bacteriocinas, visto que se registaram algumas alterações nas frações de proteínas celulares .

#### 4.5. Pulse Field Gel Eletroforeses (PFGE)

Pelo método do PFGE foram analisados 16 isolados do género *Staphylococci* escolhidos aleatoriamente mas representantes das indústrias, cinco são *Staphylococcus equorum* e onze *Staphylococcus xylosus*.

Na figura 5 observam-se os vários fragmentos de restrição de grande dimensão, dos *Fingerprintings* dos diferentes isolados.

Figura 5 - Representação dos *Fingerprintings* obtidos por PFGE.



Ao analisar a figura acima representada observa-se a divisão em dois grupos distintos como seria de esperar, o primeiro é referente aos *Staphylococcus equorum* e o segundo aos *Staphylococcus xylosus*. No entanto o segundo grupo apresenta um nível de similaridades entre os isolados bastante superior (78,3%) relativamente ao primeiro (50,7%).

O primeiro grupo é proveniente da indústria A, no entanto observa-se grande diversidade genética.

Observa-se a formação de 2 ramos com um nível de similaridade superior a 90% no 2º grupo, o que significa que os isolados são possíveis clones apesar de no primeiro ramo existirem representantes originários de diferentes indústrias, B e C.

#### 4.6. PCR de Detecção da presença dos Genes de Resistência *tet*(M), (L) e (K)

As estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *equorum* amplificaram por PCR para os genes de resistência à tetraciclina, *tet*(M), específico para o mecanismo relacionado com a produção de Proteínas Protetoras Ribossomais (PPR) e os *tet*(L) e *tet*(K) que estão relacionados com a regulação da bomba de efluxo para a tetraciclina.

Dos 41 *Staphylococcus xylosus* estudados, 30 isolados apresentaram pelo menos um dos genes. O gene de resistência *tet*(K) teve incidência em 29 isolados sendo que 70,3% são da

industria B, 26,8% da C e apenas 2,5% da A. O gene *tet(M)* observou-se em 4 isolados todos provenientes da indústria C. O gene *tet(L)* teve 4 isolados positivos originários das três indústrias. Os isolados S2M7 e S2M2 com origem na industria C apresentam os três genes de resistência em simultâneo. Outros dois isolados, P1B4 e C1C3 apresentam em simultâneo a *tet(K)* e a *tet(L)* e o isolado, S3M5 apresenta a *tet(M)* e a *tet(K)*.

Dos 17 *Staphylococcus equorum* estudados, todos apresentaram o gene de resistência *tet(K)*, o isolado C2C8 apresentou ainda em simultâneo o gene de resistência *tet(M)*, nenhum dos isolados apresentou o gene codificante *tet(K)*. No entanto é de notar que apesar de serem portadores de genes de resistência, fenotipicamente a maioria dos isolados não é resistente à tetraciclina. A análise comparativa efetuada através de um software denominado *Bionumerics Applied Math* pode observar-se em anexo nas Figuras e e f.

#### 4.7. Suscetibilidade Fenotípica à Oxacilina

Foram analisados um total de 27 isolados SCN que apresentaram resistência à penicilina em estudos prévios, quanto à sua sensibilidade ao antibiótico Oxacilina (1 µg) e novamente à Penicilina (10 UI), aplicando-se os critérios tabelados mais recentes( *CSLI*, 2013). Na tabela 6 observam-se os isolados estudados e a sua qualificação quando sujeitos aos antibióticos.

Tabela 8 - *Staphylococcus Coagulasse Negativa* testados, qualificados como resistentes (R) ou sensíveis (S).

Isolados	CV2C4	CV2C3	CH2C5	CH2C6	P2B3	L1B4	L2M4	P2B4	S4B4	L3M2	L1B3	C1C3	S3B5	L1B2	S2M7	L2B1	P3B2	S3B4	P1B4	L1B1	S4B5	P1B1	L3M4	S3B1	L1M1	L2B2	S4B1
P10	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	S	S
OX1	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Verificou-se que os isolados em estudo, apresentaram mais frequentemente resistência à Penicilina (44,44%) do que à Oxacilina (25,93%).

Os isolados CV2C4, CV2C3, CH2C5 e CH2C6 são *Staphylococcus equorum* provenientes da industria A, enquanto que, os restantes são *Staphylococcus xylosus* 18 com origem na industria B, quatro na C e um na A. Quatro isolados, P2B3 e S3B5 (indústria B), CH2C6 e C1C3 (indústria A) apresentam-se resistentes a ambos os antibióticos, no entanto também se verifica que doze dos isolados, são sensíveis aos dois antibióticos.

## 5. Discussão de Resultados

Da coleção de estirpes de SCN, 41 pertenciam à espécie *Staphylococcus xylosus* e 17 à de *Staphylococcus equorum*, provenientes de diferentes indústrias.

A aplicação da técnica de PCR *fingerprinting* permitiu observar os diferentes perfis genéticos. Dos dendrogramas obtidos pode-se referir que nem todas as estirpes mostram relação entre o perfil genético e a indústria de onde são provenientes demonstrando-se uma vasta variedade genética (Carvalho, 2010; Talon *et al.*, 2011).

O método do PFGE é considerado um método fiável, facilmente reproduzível mas extremamente exaustivo e prolongado, por outro lado o método de REP-PCR é mais simples e rápido que o anterior mas apresenta menor poder discriminatório e menor reprodutibilidade entre diferentes laboratórios. Assim sendo, resultados obtidos por ambos os métodos não se sobrepõem completamente (Netto dos Santos *et al.*, 2001). Ao aplicar a técnica de PFGE, verificaram-se perfis com maior número de bandas e nível de similaridade, relativamente aos obtidos anteriormente por PCR *fingerprinting*.

Dada a importância da segurança das estirpes de SCN isoladas de produtos cárneos fermentados para futura utilização com cultura de arranque, a ausência de resistência a antibióticos foi um critério determinante neste trabalho.

Analisaram-se 27 isolados, que apresentaram resistência à penicilina em estudos prévios (Gonçalves E., 2013), quanto à sua sensibilidade ao antibiótico Oxacilina (1 µg) e novamente à Penicilina (10 UI) verificando-se uma resistência de 44,44% à Penicilina e de 25,93% à Oxacilina.

A maioria da pesquisa relativa à resistência ao antibiótico metilicina por parte de isolados de *Staphylococcus* de origem alimentar foca-se na espécie *S. aureus*, prestando-se menos atenção ao grupo dos SCN, no entanto estudos recentes começam a focar especificamente este grupo, devido à importância da transferência horizontal de genes e existência de elementos moveis (Taponen *et al.*, 2006; Unal & Cinar, 2012; Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2014).

A tetraciclina é outro antibiótico vastamente utilizado em clínica animal e humana. É de extrema importância determinar a incidência de resistência e de elementos móveis transmissíveis em estirpes que poderão ser utilizadas como culturas *starter*, como por exemplo *S. xylosus* e *S. equorum*.

É importante referir que a resistência à tetraciclina é frequente em diferentes espécies de *Staphylococcus*, sendo codificada por uma ampla variedade de determinantes genéticos, (De Vries *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2012).

Neste trabalho a pesquisa de genes que codificam para bombas de efluxo para a tetraciclina, resultou numa frequência 9,76% no caso do *tet(L)* e frequência de *tet(K)* que se apresentou em 100% dos isolados no grupo dos *S. equorum*.

Ao pesquisar o gene *tet(M)* que é específico da proteção ribossomal, verificou-se que este se encontra presente em apenas 4 isolados *S.xylosus* e em 1 isolado *S.equorum*, tal demonstra que podem existir outras tets associadas a PPR, nomeadamente as *tet(O)*, *tet(Q)* ou *tet(S)* (Clermont *et al.*, 1997).

Assim, as resistências observadas nos casos em que não se detetou a presença dos genes em estudo, podem dever-se à presença de genes que não foram pesquisados como *tet(W)*, *tet(S)*, *tet(O)*, *tet(Z)*, *tet(W/S)*, entre outras (Lahtinen *et al.*, 2009). Do mesmo modo verificou-se a existência de isolados com pelo menos um dos genes e até mesmo todos os genes em estudo que não apresentaram resistência à tetraciclina, isto significa que apesar do gene estar presente não implica que este se manifeste, pois existem fatores que podem impedir a sua manifestação, como por exemplo, as condições de meio, os sinais bioquímicos e os mecanismos de biossíntese da proteína codificada pelo gene (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2012).

Diversos autores referem que *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* isolados dos produtos cárneos fermentados são frequentemente resistentes à penicilina e à tetraciclina (Marty *et al.*, 2012). Segundo Resch *et al.* (2008) num total de 137 isolados de *Staphylococcus xylosus*, 69 % foram resistentes à penicilina e 36 % à tetraciclina e Even *et al.*, (2010) relataram que 32 % dos isolados em estudo foram resistentes à penicilina e 17 % à tetraciclina.

Sabendo-se que das BAL encontradas atualmente em produtos cárneos fermentados as espécies de *Lactobacillus* são dominantes (Chaillou *et al.*, 2005), estudou-se ainda uma coleção de 71 *L. plantarum* e de 33 *L.sakei*, isolados de amostras de vários produtos cárneos fermentados, recolhidas de diferentes indústrias.

A metodologia de PCR *Fingerprinting* foi fundamental para permitir a caracterização genética dos isolados. Através da elaboração de dendrogramas foi determinada a semelhança entre isolados e foi possível observar uma vasta diversidade genética confirmando resultados prévios (McLeod *et al.*, 2008; Bringel *et al.*, 2001). De modo geral verifica-se que os isolados agrupam-se de acordo com a indústria de onde são originais existindo, no entanto, exceções. Apesar de a coleção de *Lactobacillus* utilizada ser composta maioritariamente por *Lactobacillus plantarum*, a literatura mostra que durante a fermentação e maturação dos produtos, os isolados de *Lactobacillus sakei* e *L.curvatus* são de longe as espécies mais presentes existindo em menor quantidade isolados de *Lactobacillus plantarum* (Fontana *et al.*, 2014).

Abordagens recentes na conservação de produtos cárneos estão cada vez mais direcionados para o controle biológico utilizando estirpes de *Lactobacillus*, com potencial bacteriocinogênico, como microbiota de proteção para inibir o crescimento de *Listeria*

*monocytogenes* e outros microrganismos indesejados (Castellano, Holzapfel, & Vignolo, 2004; Hugas *et al.*, 1998; Mataragas, Metaxopoulos, Galiotou, & Drosinos, 2003).

Através da técnica de PCR, utilizada para detectar a presença de genes que codifiquem para bacteriocinas, verificou-se que a maioria dos isolados contém esses mesmos genes, confirmando conclusões presentes em estudos recente, para o caso dos *L. plantarum* (Diep *et al.*, 2009; Zacharof & Lovittb, 2012) e relativamente aos isolados de *L. sakei* (Todorov *et al.*, 2013).

Observou-se uma baixa frequência do gene *plnA* (19,72%), tal não é desejável uma vez que segundo Diep *et al.* (2009) e Zacharof & Lovittb, (2012), o *plnA* para além de ter atividade antimicrobiana, funciona como um péptido feromona que induz a transcrição de todos os loci *pln*.

A maioria dos *Lactobacillus plantarum* apresentou pelo menos um gene que codifique para plantaricinas, mas é possível verificar que os isolados originários das indústrias B e D são os que apresentam maior número de genes, destacando-se o isolado P3B7 que contém os dez genes em estudo.

No caso particular dos *Lactobacillus sakei*, ao realizar a pesquisa de genes que codificam para sacacinas, averiguou-se que apenas três dos isolados apresentavam os genes e nenhum apresentou o gene *sakA*, este resultado está de acordo com o obtido por Todorov *et al.*, 2013, que ao utilizarem o ADN dos *L. sakei* ST22Chor e ST153Ch nas mesmas reações de PCR também obtiveram um resultado negativo.

Ao analisar o perfil de proteínas totais do isolado P3B7 (*L. plantarum*), observou-se que a fração proteica produzida, onde poderão estar incluídas bacteriocinas, não é diretamente proporcional às condições de crescimento favoráveis para as bactérias (Aasen, Moreto, Katla, Axelsson, & Storro, 2000; Todorov *et al.*, 2000; Todorov *et al.*, 2013 Aasen *et al.*, 2003; Krier *et al.*, 1998; Matsusaki *et al.*, 1996).

Para determinar com total certeza a aplicação de um isolado como cultura *starter* ou protetora, os isolados de *Staphylococcus* que se destacaram teriam de ser totalmente caracterizados, tanto geneticamente, como fenotipicamente, nomeadamente, quanto à sua capacidade tecnológica (atividade proteolítica, lipolítica, resistência a diferentes condições de sal e pH, etc.). Os isolados de *Lactobacillus plantarum* e *L. sakei* que apresentam elementos genéticos que conferem a capacidade de produzir bacteriocinas deverão ser avaliados em competição com agentes patogénicos, determinando-se se a atividade inibitória se traduz pela produção de bacteriocinas e não só pela produção de outras substâncias de menor interesse.



## 6. Conclusões

O estudo do perfil genético de isolados de *Staphylococcus* e *Lactobacillus* provenientes de diversas indústrias e produtos em estudo demonstrou existir uma vasta diversidade genética com algumas associações de alguns grupos à sua origem.

Os valores de resistência aos antibióticos demonstrados foram relativamente baixos, dos 27 SCN testados 44,44% mostrou-se resistente á penicilina (10U) e 25,93% á oxacilina (1µg). É de salientar que 14,8% dos isolados resistente a ambos os antibióticos poderão conter um determinante genético móvel de resistência MRS pelo que não deverão ser utilizados em cultura *starter* pelo facto de poder existir o risco de transferência desse determinante a outras bactérias do microbioma do produto fermentado e humano.

No que diz respeito á presença de elementos de resistência á tetraciclina, o número de isolados com o gene codificante de proteínas de proteção ribossomal pesquisado *tet(M)*, foi reduzido, dos 41 *Staphylococcus xylosus* estudados apenas quatro apresentaram o gene e dos 17 *Staphylococcus equorum* apenas um manifestou conter o gene.

Relativamente à presença de genes de codificação de proteínas de bombas de efluxo, observou-se principalmente a presença do gene codificante *tet(K)*, com uma frequência de 70,7% no caso dos *S.xylosus* e de 100% no caso dos *S.equorum* enquanto que o *tet(L)* apresentou-se com uma frequência de 9,8% no caso dos *S.xylosus* e nula no caso dos *S.equorum*. Nem todos os isolados que tinham genes de resistências demonstraram resistência á tetraciclina, tal deve-se ao facto da existência do gene no genoma da bactéria não ser suficiente para a sua manifestação fenotípica. Numa perspetiva diferente observaram-se isolados resistentes que não possuíam os genes pesquisados, tal pode indicar a presença de outros fatores de resistência que poderão não estar ainda estudados. Uma posterior avaliação genética e fenotípica seria uma mais valia para pormenorizar o conhecimento.

Um recurso tecnológico importante para a seleção de uma cultura *starter* é a produção de substâncias inibidoras contra patogénicos de origem alimentar. Neste estudo, um dos passos para selecionar estirpes a serem consideradas para culturas *protetoras*, foi a ocorrência de genes codificantes de bacteriocinas.

A presença de alguns genes conhecidos codificantes de bacteriocinas foram avaliados por PCR. Dos 71 *Lactobacillus plantarum* testados, destacou-se o P3B7 por ser o único a ser portador de todos os genes relacionados com a produção de plantaricinas em estudo, é de notar que a maioria dos isolados possui pelo menos um dos genes, vários isolados possuem pelo menos cinco dos genes mencionados. Dos 33 *Lactobacillus sakei* testados destacaram-se 3 isolados L1B8, P2B3 e L3B8 que são portadores dos genes que codificam para a sacarina P e Q, no entanto os restantes isolados provaram-se desprovidos de qualquer gene relacionado com a produção das sacacinas A, P ou Q.

Do grupo dos *S.xylo**sus* destacaram-se cinco isolados, L1B1, L1M2, L2M2, L2B2, S4B1, S4B2, S4B6 e P2B1 devido às características apresentadas nas avaliações genéticas e fenotípicas realizadas neste estudo, demonstraram-se sensíveis aos antibióticos e não evidenciaram nenhum gene de resistência analisado. Estes isolados são bons candidatos para uma análise mais pormenorizada das suas propriedades tecnológicas, fisiológicas e metabólicas para determinar se são adequados para utilização num futuro próximo como culturas *starter* em produtos cárneos fermentados.

## Referências Bibliográficas

- Aasen, I.M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., & Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacinP and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 35-43.
- Aasen, I.M., Moreto, T., Katla, T., Axelsson, L., & Storro, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 159-166.
- Agapi, I. Doulgeraki, Spiros Paramithiotis, Dafni Maria Kagkli, George- John E. Nychas (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions, *Food Microbiology*, 27, 1028-1034.
- Ammor, M.S., Flórez, A.B., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24, 559-570.
- Aymerich, M.T., Hugas, M., & Monfort, J.M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Science and Technology International*, 4, 141-158.
- Bringel, F., Quénée P. and Tailliez P, 2001. Polyphasic Investigation of the Diversity within *Lactobacillus plantarum* Related Strains Revealed Two *L. plantarum* subgroups. *System. Appl. Microbiol.* 24, 561-571.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
- Casquete, R., Benito, M.J., Martin, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E., Cordoba, M.G., 2012. Microbiological quality of salchichon and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. *Food Control* 24, 191-198.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska A., Nalepa B., Sierpńska M., Laniewska-Trokenheim L., 2014. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin. Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiology* 46 222-226.
- Clermont, D., Chesneas, O., Cespédès, G. & Horaud, T., 1997. New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of tet(T) isolated from *Streptococcus pyogenes* A498. *American Society for Microbiology*, 41, 112-116.
- CLSI, (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard Third Edition, CLSI document M31-A3. Wayne, Pennsylvania, USA; pp-116.
- Cocconelli, P.S. (2007). Starter cultures: Bacteria. In Toldra F. (Ed.), *Hand book of fermented meat and poultry* (pp.137-145). Oxford: Black well Publishing Ltd.
- Cocolin, L., Foschino, R., Comi G., Fortina, M.G. (2007). Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiology*, 24, 752-758.
- Cocolin, L., Rantsiou K. 2007. Rapid methods for detection and prediction of the occurrence and virulence of pathogens in meat and meat products. *Meat Technology*, 48, 116-122.
- Dicks, L.M.T., Mellett F.D., Hoffman L.C. (2004). Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science* 66 703-708.
- Diep, D.B., Straume D., Kjos M., Torres C., Nes I. F., 2009. Na overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* 30 1562-1574.

EFSA (2011). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal 9, 10: 2393.

Elias, M., Fraqueza M.J. & Barreto, A. (2005). Typology of the traditional sausage production from Alentejo. Revista Portuguesa de Zootécnica, n.1.

EUCAST (2013). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. <http://www.eucast.org>

Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Ben Zakour, N., Chacornac, P., Lebert, I. (2010). Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. International Journal of Food Microbiology, 139, 87-95.

Fontana, C., Coconcelli P.S., Vignolo G., Saavedra L., 2014. Occurrence of antilisterial structural bacteriocins genes in meat borne lactic acid bacteria. Food Control 47 53-59.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. & McSweeney, P.L.H. (2000). Fundamentals of cheese science. Aspen Publishers, Inc., 5, 54-97.

Gao, Y., Li D., Liu X., (2014). Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausages. Food Control 1-6.

Gardini, F., Tofalo, R., Suzzi, G., 2003. A survey of antibiotic resistance in Micrococcaceae isolated from Italian dry fermented sausages. Journal of Food Protection 66(6), 937–945.

Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G., & Swings, J. (2003). Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl. and Environmental Microbiology*, 69, 1270-1275.

Gonçalves, E.S., 2013. Dissertação de mestrado “Influência do sal, pH e temperatura no desenvolvimento de estafilococos coagulase negativa isolados de produtos cárneos fermentados”.

Hammes, W.P. (2012). Metabolism of nitrate in fermented meats: the characteristic feature of a specific group of fermented foods. Food Microbiology, 29, 151-156.

Haug, M.C., Tanner, S.A., Lacroix, C., Stevens, M.J., Meile, L., 2011. Monitoring horizontal antibiotic resistance gene transfer in a colonic fermentation model. FEMS Microbiology Ecology 78, 210–219.

Holzappel, W.H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food grade enzymes. International Journal of Food Microbiology, 24, 343–362.

Hugas, M. & Ma. Monfort J. (1998). Bacterial starter cultures for meat fermentation. Food Chemistry, Vol. 59, No. 4, pp. 547-554.

Hugas, M. (1999). Meat-borne lactic acid bacteria for safety in meat and meat products. In Proceedings 17th international conference of the ICFMH (pp.44–49), September 1999. Veldhoven. The Netherlands.

Incze, K. (2004). Types of sausages: Dry and semi-dry. In M. Dikeman, C. Devine, & W.K. Jensen (Eds.), Encyclopedia of meat sciences (pp.1207–1216). Amsterdam: Elsevier.

Incze, K. (2010). In F. Toldra (Ed.), Mold-ripened sausages (Chapter 21). Hand book of meat processing. Oxford: Wiley-Blackwell.

Johnson, J.L., Doyle, M.P., & Cassens, R.G. (1990). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. In meat products. Journal of Food Protection, 53, 81–91.

Kanh, T.M. Tran, Bee K. May, Peter M. Smooker, Thi T.H. Van, Peter J. Coloe (2010). Food Research International, Volume 44, Issue 1, January 2011, Pages 338-344.

- Kastner, S., Perreten, V., Bleuer, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C., Meile, L., 2006. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology* 29(2), 145–155.
- Krier, F., Revol-Junelles, A.M., & Germain, P. (1998). Influence of temperature and Ph on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 359-363.
- Lahtinen, M.J., Boyle, R.J., Margolles, A., Frías, R. & Gueimonde, M., 2009. Safety assessment of probiotics. In D. Charalampopou-los & R.A. Rastall (eds), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (pp.1193-1225). Berlin: Springer- Verlag.
- Lauková A., Simonová M., Strompfová V. (2010). *Staphylococcus xylosus* S03/1M/1/2, bacteriocin-producing meat starter culture or additive. *Food Control* 21 970–973.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 181-186.
- Lim, K.T., Hanifah, Y.A., Yusof, M.Y.M., Thong, K.L., 2012. *ermA*, *ermC*, *tetM* and *tetK* are essential for erythromycin and tetracycline resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. *Indian J. Med. Microbiol.* 30, 203-207.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Aymerich, T., 2006. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 107(2), 148–158.
- Marty, E., Bodenmann, C., Buchs, J., Hadorn, R., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., Meile, L. (2012). Prevalence of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci from spontaneously fermented meat products and safety assessment for new starters. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 74-83.
- Marty, E., Buchs, J., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., Meile, L., 2012. Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. *Food Microbiology* 29, 157–166.
- McLeod A., Nyquist O.L., Snipen L., Naterstad K., Axelsson L., 2008. Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology* 31 393–403.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. & Pfaller, M.A. (2012). *Medical Microbiology* (7<sup>th</sup> ed.). EUA: Saunders.
- Nielson, J.W., Dickson, J.S., & Crouse, J.D. (1990). Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2142-2145.
- Ordóñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M., de la Hoz, L., 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39(4), 329–367.
- Paulsen P., Vali S., Bauer F. (2011). Quality traits of wild boar mould-ripened salami manufactured with different selections of meat and fat tissue, and with and without bacterial starter cultures. *Meat Science* 89 486–490.
- Pereira-Maia, E.C., Silva, P.P. & Almeida, W.B. (2010). Tetraciclinas e glicinas: Uma revisão geral. *Química Nova*, 33(3), 700-706.
- Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R. & Teuber, M. (2003). *Staphylococcus equorum* subespecie *linens*, subespecie nov., a starter culture for surface ripened semi-hard cheeses. *System Applied Microbiology*, 26, 30-37.

Poulsen A.B., Skov R. & Pallesen L. V. (2003). Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, 419–421.

Remiger, A., Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. (1996) Identification of bacteriocin – encoding genes in lactobacilli by PCR. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 28-34.

Resch, M., Nagel V., Hertel C. (2008). Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 127, 99–104.

Rossi, F., Tofalo, R., Toriani, S., & Suzzi, G. (2001). Identification by 16S-23SrDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 365–371.

Salysers, A.A., Gupta, A., Wang, Y.P., 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology* 12, 412–416.

Steinhauserova, I., Smola, J., & Stregnerova, H. (1998). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in meat products and identification by applied PCR method. In *Proceedings 44th International Congress of Meat Science and Technology* (pp.562–563). Madrid, Spain.

Talon, R., Leroy, S., (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science*, 89, 303-309.

Talon, R., Leroy, S., Lebert, I. (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science*, 77, 55-62.

Tanasupawat, S., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Kozaki, M. & Komagata, K. (1992). Identification of *Staphylococcus carnosus* strains from fermented fish and soy sauce mash. *Journal of Genetic Applied Microbiology*, 37, 479-498.

Todar, K. (s.d.). Bacterial Resistance to Antibiotics. Em Todar's Online Textbook of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial>

Todorov, D. S., Rachman C., Fourrier A., Dicks T.M.L., vanReenen A.C., Prévost H., Dousset X. (2011). Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe* 17, 23–31.

Todorov, S.D., Vaz-Velho M., Melo Franco B.D.G., Holzapfel W.H., 2013. Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicão, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control* 30 111-121.

Vidal-Carou, M. C., Venciana-Nogués, T., Latorre-Moratalla, M. L. & Bover-Cid, S. (2007). Biogenic Amines: risks and control. In: F. Todrá (ed.), *Handbook of fermented meat and poultry*. Ames, IA: Blackwell Publishing Professional. 455-468.

Wigley, R.C. (1999). Starter Cultures: Uses in Food Industry. In R.K, Robison, C.A. Batt & P.D., Pater (Eds.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 2084-2094). San Diego: Academy Press.

Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Gotz, F. (2008). Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *International journal of food microbiology*, 127, 246-251.

## Anexo

**Figura a:** Dendrograma de semelhança genômica para *Staphylococcus xylosus* obtido a partir dos perfis de PCR-*fingerprinting* com os primers M13 e OPC19. Linha vermelha: nível de reprodutibilidade (60%). As relações de semelhanças foram calculadas usando o coeficiente de correlação de *Pearson* e os grupos formados através do método média aritmética não ponderada (UPGMA).

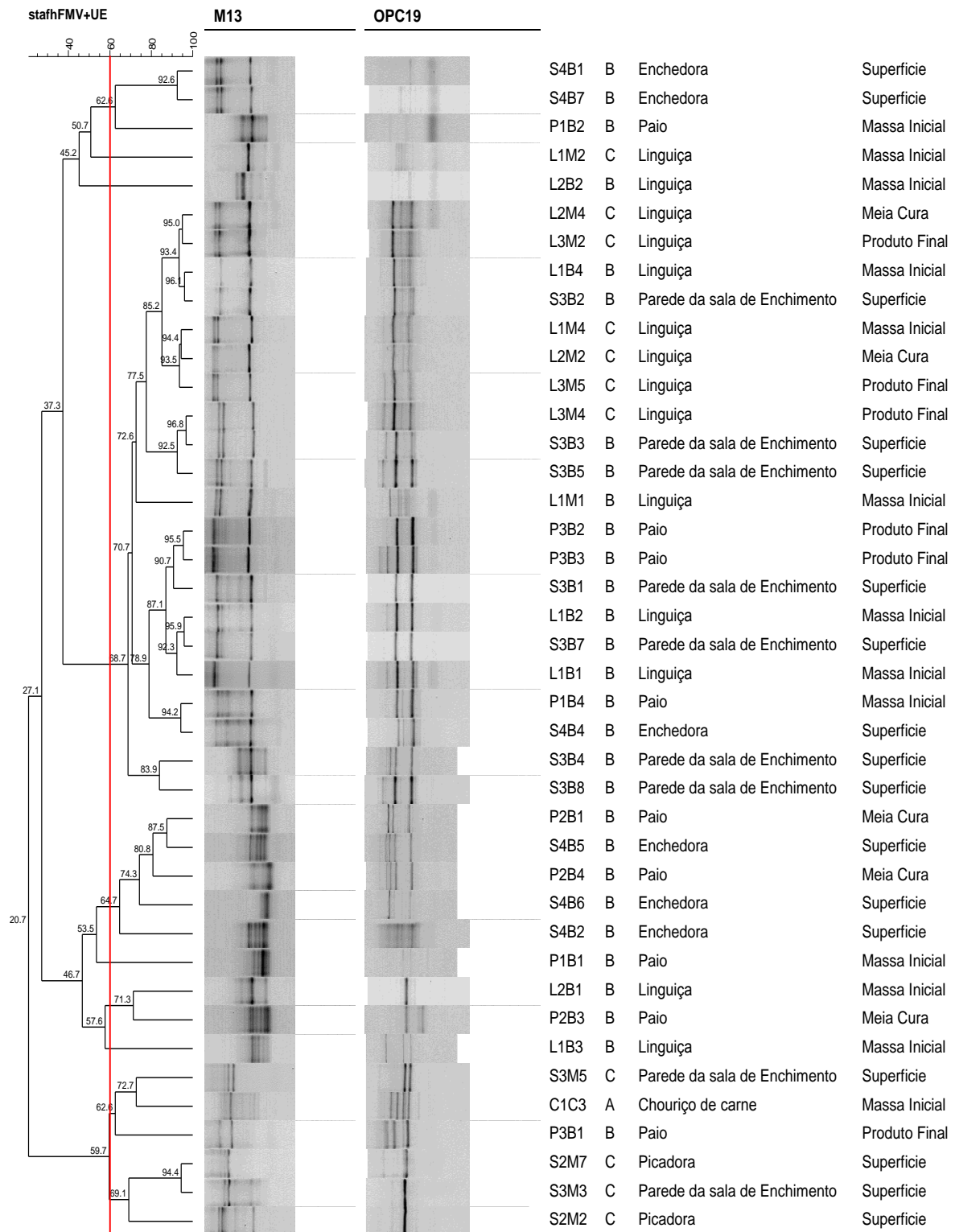


Figura b: Dendrograma de semelhança genômica para *Staphylococcus equorum* obtido a partir dos perfis de PCR-*fingerprinting* com os primers M13 e OPC19. Linha vermelha : nível de reprodutibilidade (60%). As relações de semelhanças foram calculadas usando o coeficiente de correlação de *Pearson* e os grupos formados através do método da média aritmética não ponderada (UPGMA).

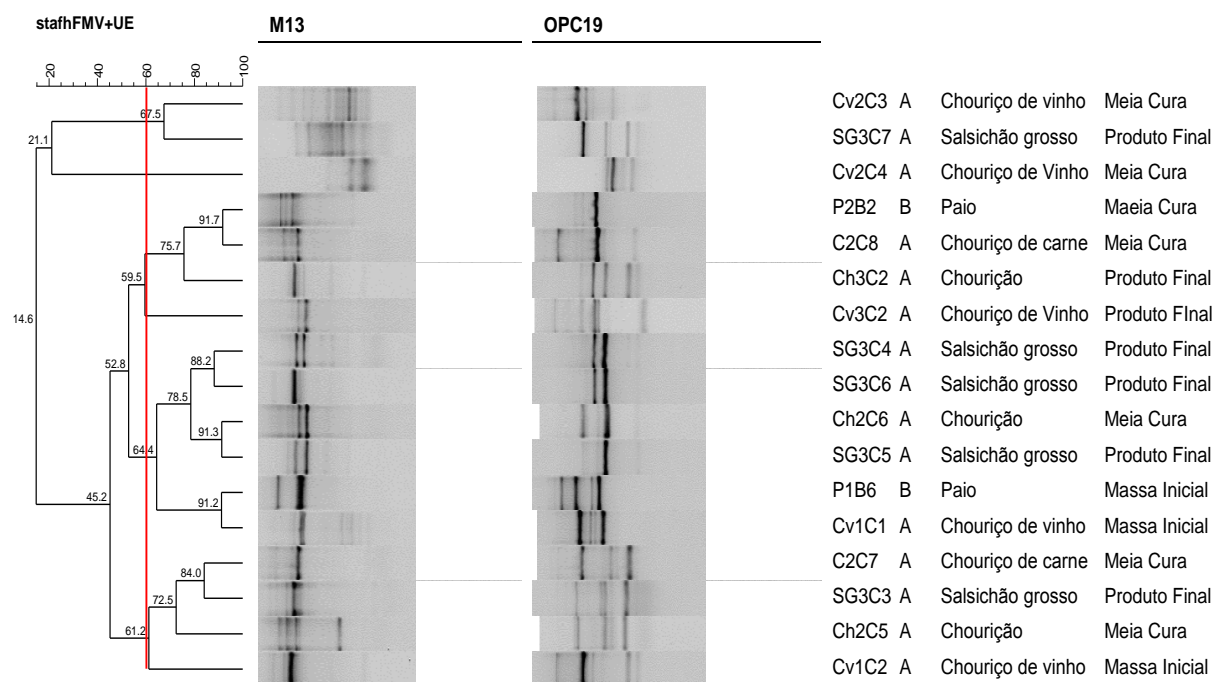




Figura c: Dendrograma de semelhança genómica para *Lactobacillus plantarum* obtido a partir dos perfis de PCR-fingerprinting com os primers M13 e OPC19. Linha vermelha: nível de reprodutibilidade (60%). As relações de semelhanças foram calculadas usando o coeficiente de correlação de Pearson e os grupos formados através do método da média aritmética não ponderada (UPGMA).

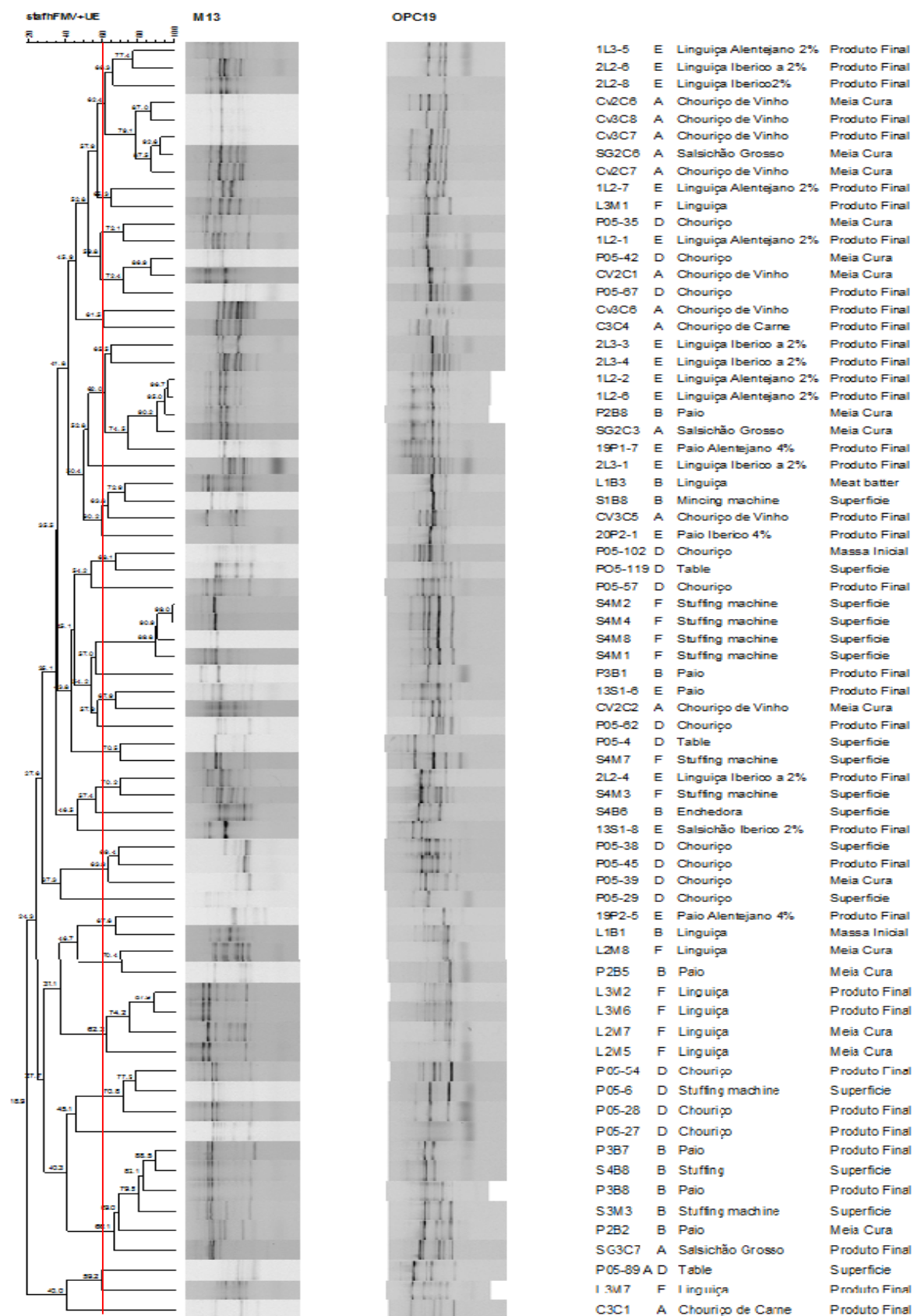


Figura d: Dendrograma de semelhança genómica para *Lactobacillus sakei* obtido a partir dos perfis de PCR-fingerprinting com os primers M13 e OPC19. Linha vermelha: nível de reprodutibilidade (60%). As relações de semelhanças foram calculadas usando o coeficiente de correlação de *Pearson* e os grupos formados através do método da média aritmética não ponderada (UPGMA).

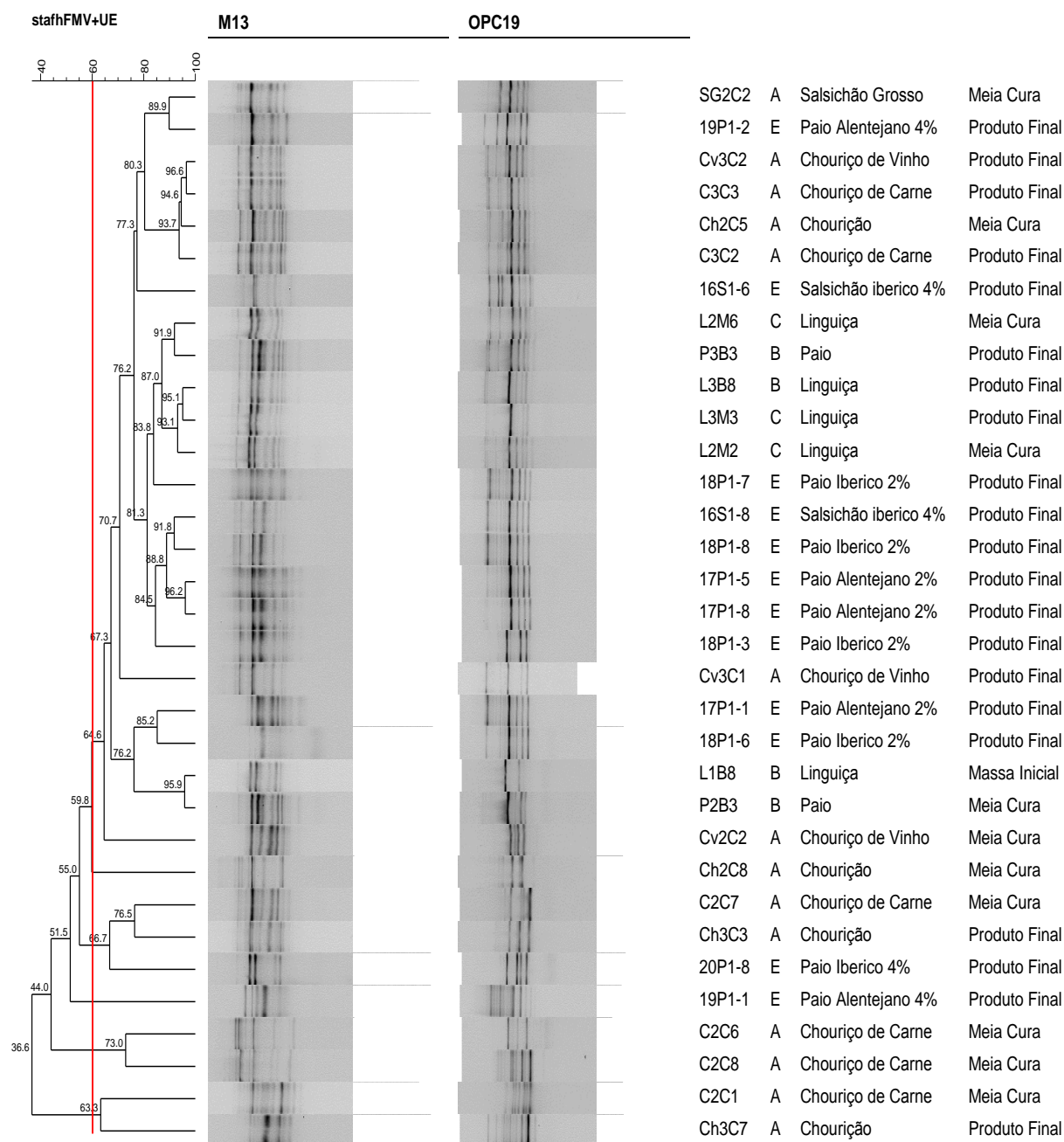


Figura e - Análise Comparativa para *Staphylococcus xylosus*.

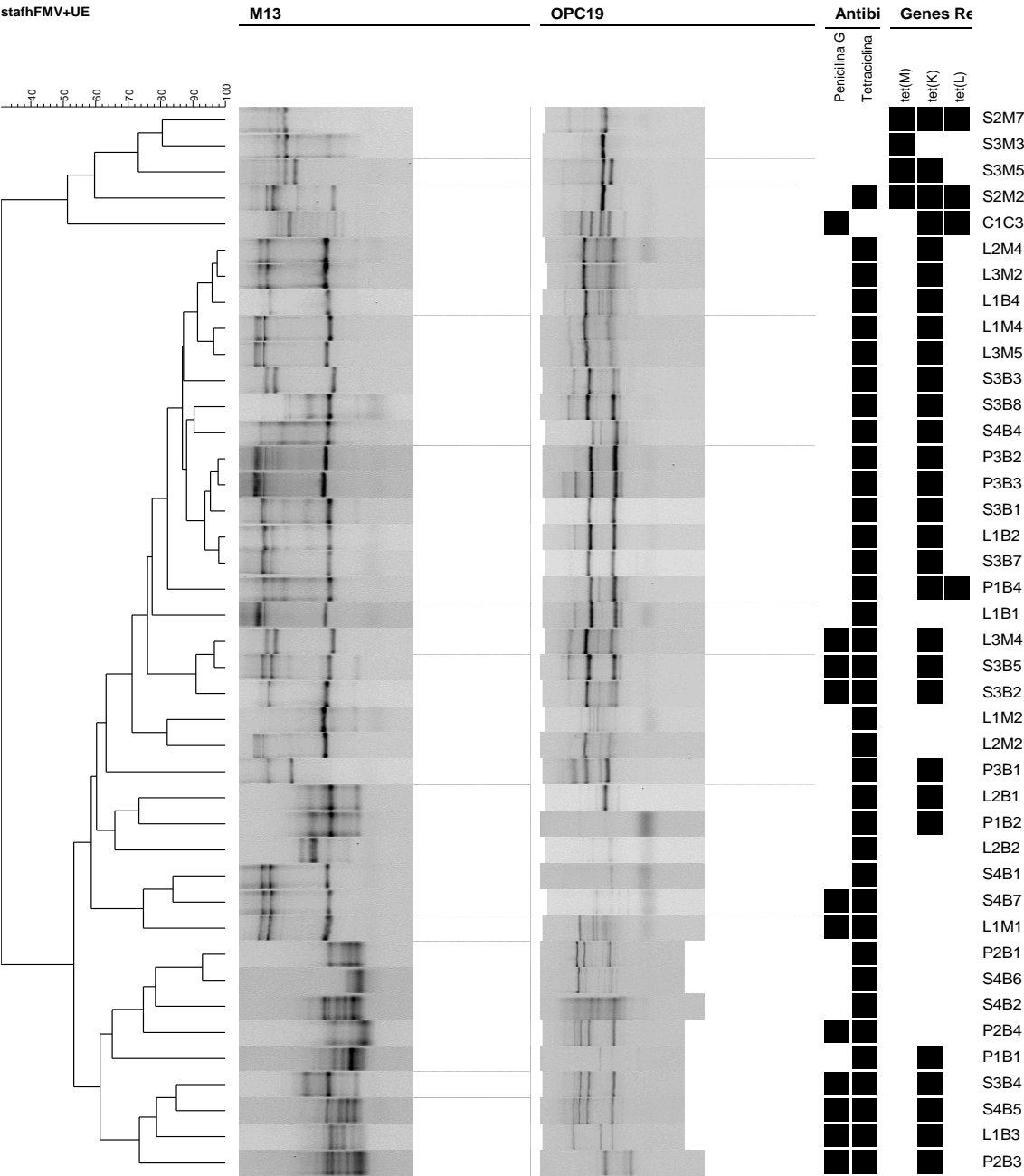


Figura f - Análise Comparativa para *Staphylococcus equorum*.

